

University of Groningen

Histologisch onderzoek van de plasmacellulaire reactie en zijn plaats in de histofysiologie van de lymphklier

Buchem, Frans Lodewijk van

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1962

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Buchem, F. L. V. (1962). *Histologisch onderzoek van de plasmacellulaire reactie en zijn plaats in de histofysiologie van de lymphklier*. [Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Histologisch onderzoek
van de plasmacellulaire reactie
en zijn plaats in de
histophysiologie van
de lymphklier

F. L. VAN BUCHEM

HISTOLOGISCH ONDERZOEK
VAN DE PLASMACELLULAIRE REACTIE
EN ZIJN PLAATS IN DE
HISTOPHYSIOLOGIE VAN DE LYMPHKLIER

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. F. H. L. VAN OS,
HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER
WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE
TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 28 FEBRUARI 1962
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

FRANS LODEWIJK VAN BUCHEM
GEBOREN TE TILBURG

Promotor: Prof. Dr. F. J. KEUNING

STELLINGEN

I.

De door CONWAY aangevoerde argumenten, waarop het bestaan van een normale cyclus der follikels van het lymphoïde systeem wordt gebaseerd, zijn onjuist.

II.

Op grond van de huidige experimentele gegevens is het onwaarschijnlijk dat de lymphocyt een korte levensduur heeft.

III.

De anamnese, de electrocardiografische gegevens en de obductie bevindingen geven vaak verschillende of zelfs tegenovergestelde informatie over de ernst van ischaemische hartafwijkingen.

IV.

Bij subunguale gezwellen dient men rekening te houden met de mogelijkheid van een maligne melanoom.

V.

Het verdient aanbeveling, een onderzoek te verrichten naar het vóórkomen van ulcus pepticum, bij kinderen met zich herhalende buikklachten.

VI.

Een verdere toename van de perceptiedoofheid, optredende bij lawaaidove personen, die reeds jaren achtereen blootgesteld zijn aan eenzelfde lawaai-bron, moet op rekening geschreven worden van presbycusis.

VII.

Bij het „syndrôme thalamique” dient men met de mogelijkheid van een laedering van de parietaalschors rekening te houden.

VIII.

Het onderzoek van de fundus oculi geeft slechts zelden aanwijzingen voor het bestaan van atherosclerose.

IX.

De toepassing van de moderne psychopharmaca heeft de prognose bij psychiatrische patienten aanzienlijk verbeterd.

X.

Het valt te betwijfelen of een thans komende positieverbetering voor het wetenschappelijk personeel aan de universiteiten, nog de schade kan herstellen die door het personeelsverloop is ontstaan.

Aan mijn Vader en Moeder
Aan Charly

Dit proefschrift werd bewerkt in het Histologisch Laboratorium te Groningen (Hoofd: Prof. Dr. F. J. Keuning) met medewerking van: Els Okma-Binkhorst, Gerry Blank-Fokkema, Mieke Bakker, Tienieke de Vries en Adie Hijink, die allen op bijzonder prettige wijze hun hulp als analisten ter beschikking stelden, Mej. A. Kuis en Mej. H. Anthonio die het manuscript verzorgden, de Heer Th. Groen, Jan Feringa, Arie Hermse en Henk Boéré, die de onmisbare technische bijstand verleenden, Jan Holtman die op voortreffelijke wijze de dieren verzorgde en Jacob Klok, Ietse Stokroos en Gabe Penterman die bij de operaties trouw hun diensten bewezen.

Dr. H. C. Stam (Hoofd van de Therapeutische afdeling van de Radiologische kliniek) hielp ons bij de berekening van de stralingsdosering en stelde zijn afdeling gastvrij voor ons open; Mej. S. Visser was altijd bereid ons daar te ontvangen.

Dr. A. E. Beute (Streeklaboratorium van Volksgezondheid) bereidde het paratyphusvaccin.

De Heer R. L. Drain, B.A. corrigeerde de summary.

Collega J. J. Wachters verleende hulp bij het vervaardigen van een gedeelte van het fotografisch materiaal.

De Heer G. Lode verzorgde de afwerking van de grafieken.

Al deze personen, die direct bij het werk betrokken waren, maar ook allen die op zeker niet geringere wijze indirect het tot stand komen van dit proefschrift hebben mogelijk gemaakt, wil ik hier van harte dank zeggen.

INHOUD

HOOFDSTUK I

Blz.

<i>De histologie van de lymphklier en het probleem van de antilichaamvorming</i>	1
Inleiding	1
Algemene bouw van de normale lymphklier	4
Overzicht van de literatuur betreffende de plasmacellulaire reactie in de lymphklier	8

HOOFDSTUK II

<i>Onderzoek naar de histologische veranderingen, in het bijzonder de plasmacellulaire reactie, in de lymphklier na antigeentoediening</i>	16
Materiaal en methoden	16
Microscopisch onderzoek van de normale lymphklier van het konijn	18
De „primary response” van de lymphklier op Paratyphus-B vaccin	22
de histologische veranderingen in de lymphklier	22
de antilichaamproductie in weefselculturen van lymphklier, milt en beenmerg na subcutane antigeentoediening.	33
samenvatting en discussie	36
De „primary response” van de lymphklier op paarden gamma-globuline	38
samenvatting en discussie	46
De „secondary response” van de lymphklier op Paratyphus-B vaccin	47
samenvatting en discussie	54
De „secondary response” van de lymphklier op paarden gamma-globuline	54
samenvatting en discussie	62
De „primary response” bij sublethaal bestraalde dieren	64
samenvatting en discussie	70

HOOFDSTUK III

<i>De plaats van de plasmacellulaire reactie in de histofysiologie van de lymphklier.</i>	71
SAMENVATTING	86
SUMMARY	94
LITERATUUR	104

HOOFDSTUK I

DE HISTOLOGIE VAN DE LYMPHKLIER EN HET PROBLEEM VAN DE ANTILICHAAMVORMING

INLEIDING

De histologie — weefselleer — behoort zich niet te beperken tot het onderzoek van de fijnere bouw der weefsels maar moet ook omvatten de bestudering van de functie daarvan, al was het alleen hierom, dat zonder inzicht in de functie ook de fijnere bouw niet of slechts gebrekkig te begrijpen is. Dit geldt, zeer in het bijzonder, ook voor de histologie van de lymfklier. Reeds bijna een eeuw is men vrij nauwkeurig op de hoogte met de microscopische bouw van dit orgaan. Doordat men echter bijzonder slecht geïnformeerd is over wat zich in de lymfklier afspeelt, is het inzicht in de betekenis van de microscopische bouw zeer beperkt gebleven.

Van oudsher heeft men *lymphocytenvorming* als één van de belangrijkste functies van de lymfklier beschouwd. Een duidelijk bewijs voor lymphocytenvorming in de lymfklier is echter tot nu toe niet geleverd en over de localisatie van deze eventuele lymphocytopoïese bestaat nog verschil van mening. Een tweede functie, met veel grotere zekerheid aan de lymfklier toe te schrijven, is de zogenaamde *filtratie-functie*. De lymfe, die in de periphere bindweefselgebieden ontstaat en vandaar door de lymfhebanen wordt afgevoerd, passeert de regionale lymfklieren en wordt hier door de phagocytotische werkzaamheid van de reticulumcellen van ongerechtigheden ontdaan. Een derde, reeds lang vermoede, functie van de lymfklier is de *antilichaamvorming*, waarvoor McMASTER en HUDACK in 1935 het bewijs leverden. Waar deze antilichaamvorming in de lymfklier plaats vindt is eveneens onbekend. Gezien dit klaarblijkelijk gebrek aan inzicht in de functies van de lymfklier, resp. van de processen die er zich afspelen, is het begrijpelijk, dat ook het inzicht in de betekenis van de fijnere bouw van het orgaan en van de cytologische details der aanwezige celtypen zeer beperkt is.

Het onderzoek, waarvan in dit proefschrift verslag wordt uitgebracht, betreft voornamelijk de histologie van de antilichaamvorming in de

lymphklier. Daarbij zijn een aantal gegevens verkregen die niet alleen het inzicht verdiepen in de processen, welke zich in verband met deze antilichaamvorming in de lymphklier afspelen, maar die ook een geheel andere beoordeling mogelijk maken van de overige functies van de lymphklier met name van de lymphocytopoïese.

Aanvankelijk zijn door HELLMAN (1921) de merkwaardige en toen reeds lang bekende reacties, die zich afspelen in de follikels van de lymphklier, in verband gebracht met antilichaamvorming. Veel later, in 1937, wezen BING en PLUM op de mogelijkheid dat plasmacellen, die in alle lymphoïde organen in wisselende aantallen voorkomen, verantwoordelijk zouden zijn voor de vorming van antilichamen. Het is tenslotte FAGRAEUS geweest, die in 1948 met weefselkweekproeven heeft kunnen aantonen, dat inderdaad de plasmacel de antilichaamvormende cel is. Deze laatste onderzoekster heeft bovendien de aandacht gevestigd op het bijzonder belangrijke feit, dat deze plasmacellen nieuw *ontstaan* in reactie op het toedienen, resp. binnendringen van antigenen. Het ontstaan en de differentiatie van plasmacellen, tesamen genoemd de *plasmacellulaire reactie*, heeft plaats in het lymphoïde weefsel in de ruimste zin, d.w.z. in milt, lymphklier, etc., maar ook in mononucleairen-infiltraten, echter niet in de thymus. De preciese localisatie van de plasmacellulaire reactie in de lymphklier is tot nu toe niet nauwkeurig onderzocht. Weliswaar was het sinds lang bekend, dat plasmacellen in de lymphklier voornamelijk worden gevonden in de mergstrengen, maar noch de processen, die tot de vorming van deze plasmacellen leiden, noch de rol die de andere cel-elementen van de lymphklier hierbij eventueel spelen zijn voldoende bestudeerd. Dit laatste vooral is een fundamenteel probleem. Indien de jonge plasmacellen „de novo” ontstaan in reactie op een antigene prikkel, moet plasmacelvorming althans primair berusten op een celtransformatie. Wat speelt zich nu af tussen het moment van antigeen toediening en het ontstaan van de jonge plasmacellen? Deze vraag kan in tweeërlei richting nader worden geformuleerd: (i) welke cellen zijn verantwoordelijk voor de *effectieve* antigeenopname, d.w.z. die opname welke leidt tot het ontstaan van de antilichaamvormende plasmacellen, en (ii) uit welke cellen, mogelijk dezelfde mogelijk ook andere, ontstaan deze plasmacellen? In de immunologische literatuur wordt het probleem gewoonlijk omschreven als de vraag, welke zijn de „immunologically competent cells”?

Eén van de oorzaken waardoor over de juiste localisatie en de toedracht van de plasmacellulaire reactie in de lymphklier zo weinig bekend is, is dat de meeste onderzoekers slechts het vóórkomen van plasmacellen hebben nagegaan na meerdere antigeeninjecties. Bij de enkele onderzoeken, waarbij slechts een éénmalige antigeentoediening is toegepast, is ófwel onvoldoende onderscheid gemaakt tussen de jeugdvormen van resp. lymphocyten en plasmacellen, waardoor lymphocytopoiese en plasmacellenvorming met elkaar zijn verward (EHRICH c.s.; 1949 en HARRIS c.s.; 1949), ófwel is de keuze van het antigeen zodanig geweest dat slechts een geringe plasmacellulaire reactie werd gevonden, waardoor omtrent de localisatie daarvan nauwelijks enige conclusie mogelijk was (LEDUC, COONS en CONOLLY; 1955). Een enkele maal is ook onvoldoende rekening gehouden met het feit, dat na intraveneuze antigeentoediening de plasmacellulaire reactie zich in hoofdzaak in de milt ontwikkelt, na subcutane of intramusculaire toediening voornamelijk in de regionale lymphklier.

In het hier volgende onderzoek is in de eerste plaats getracht de localisatie van de plasmacellulaire reactie na eenmalige subcutane antigeentoediening, d.w.z. tijdens een zg. „primary response”, vast te stellen. Hierbij werden de histologische veranderingen in de regionale lymphklier vergeleken met de antilichaamproductie in weefselcultures van deze lymphklieren en met het titerverloop in het bloedserum. In de tweede plaats is de plasmacellulaire reactie onderzocht gedurende een „secondary response”, waarbij enige weken na antigeentoediening een tweede injectie van hetzelfde antigeen werd gegeven. Bij dit deel van het onderzoek is de plasmacellulaire reactie in de lymphklier alleen vergeleken met het verloop van de antilichaamtiter in het bloedserum. Tenslotte zijn plasmacellulaire reactie en verloop van serumtiters onderzocht tijdens „primary response” bij proefdieren na sublethale röntgenbestraling, een behandeling, waardoor vrijwel selectief de lymphfollikels in de lymphklieren tot verdwijning worden gebracht.

Uit dit onderzoek is gebleken, dat de plasmacellulaire reactie in de lymphklier tot nu toe in wezen verkeerd beoordeeld is. Men heeft alleen oog gehad voor de aanwezigheid van plasmacellen in de mergstrengen, zoals dat vooral *na* een „secondary response” blijkt te worden gevonden; de veranderingen, die in de lymphocytenvelden van de schors in de lymphklier optreden, zowel tijdens „primary” als tijdens „secondary response”,

zijn òf over het hoofd gezien, òf ten onrechte als lymphocytenvorming geïnterpreteerd. Het is begrijpelijk dat hierdoor tevens een foutieve voorstelling is ontstaan omtrent de lymphocytopoïese in de lymphklier en dat deze hierdoor, met name quantitatief, is overschat. Hier komt bij, dat uit onderzoeken van de laatste jaren over de dynamiek van de lymphocytencirculatie en -recirculatie eveneens de suggestie naar voren is gekomen, dat de nieuwvorming van lymphocyten in de diverse lymphoïde organen veel geringer is dan gewoonlijk werd aangenomen. In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift is daarom een poging gedaan een nieuwe voorstelling op te bouwen van de histofysiologie van de lymphklier, waarbij met deze omstandigheden is rekening gehouden.

ALGEMENE BOUW VAN DE NORMALE LYMPHKLIER

De lymphklieren liggen als het ware op plaatsen waar meerdere lymphbanen zich samenvoegen tot één grotere. Men zou de lymphklier dus kunnen zien als een verwijding van de lymphbaan op dit knooppunt. Deze „verwijding” is doorschoten met een ruimtelijk netwerk van reticulumcellen, waarbij in dit reticulum de ophopingen van lymphoïde cellen zijn gelegen. De lymphklier is dan een min of meer boonvormig orgaan, waarin meerdere afferente lymphbanen aan de omtrek binnentreden en waaruit één enkel efferent vat ontspringt aan de zg. hilus van het orgaan. Het hilus gebied is ook de plaats waar de arterien en venen de lymphklier binnentreden resp. verlaten. De grote vertakkingen aan deze bloedvaten zijn gelegen in een trabekel systeem, dat door het parenchym heen loopt, en dat op verschillende plaatsen samenhangt met de dunne bindweefselkapsel, die het orgaan omgeeft.

De verdeling van de lymphoïde celophopingen in het grondpatroon van reticulumcellen is zodanig, dat men een onderscheid kan maken tussen schors en merg. Dit komt duidelijk tot uiting in fig. 1. In grote lijnen kan men zeggen, dat de follikels gelegen zijn in de schors en dat in het merg slechts onregelmatige strengen van lymphoïde cellen worden gevonden met daartussen ijle, niet met lymphoïde cellen opgevulde, reticulumgebieden welke sinussen worden genoemd. Deze sinussen vormen de stroombanen voor de lymph. De afferente lymphbanen monden in de schors uit in een smalle zg. randsinus, gelegen direct onder de kapsel van het orgaan (cf. fig. 2 op pag. 6). Van hier voeren intermediaire

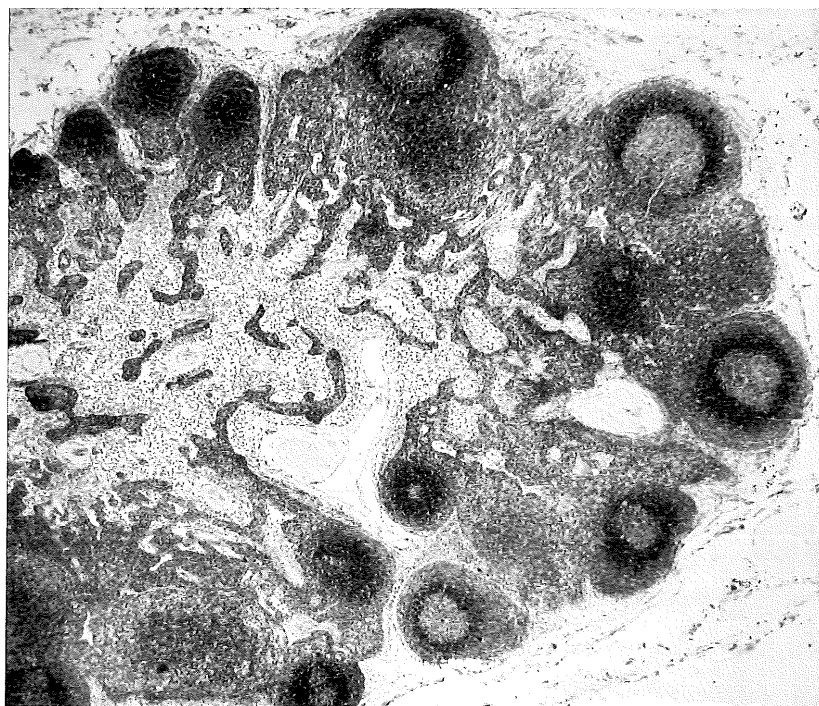


Fig. 1. Partieel overzicht lymphklier (onbekende herkomst). Duidelijke samenhang tussen mergstrengen en lymphocytovelden. K1: Haematoxyline azophloxine.

sinussen, aanwezig tussen de lymphocytenophopingen van de schors, naar de mergsinussen. Het merggebied ligt gerangschikt om de hilus van het orgaan. Hier gaan dan ook de mergsinussen over in het efferente lymfevat.

Wanneer men de lymphocytenophopingen in de schors uit fig. 1 nader bekijkt dan is duidelijk te onderscheiden, dat de daar aanwezige follikels gelegen zijn in kleinere of grotere lymphocytovelden. De kleinste van deze lymphocytovelden zijn slechts weinig groter dan de follikels zelf; aan de mergzijde gaan deze velden over in mergstrengen zodat men deze laatste kan beschouwen als onregelmatige uitlopers van deze kleine lymphocytovelden. De grotere lymphocytovelden nemen soms een hele sector van het schorsgebied in beslag (cf. fig. 2 op pag. 6) en kunnen

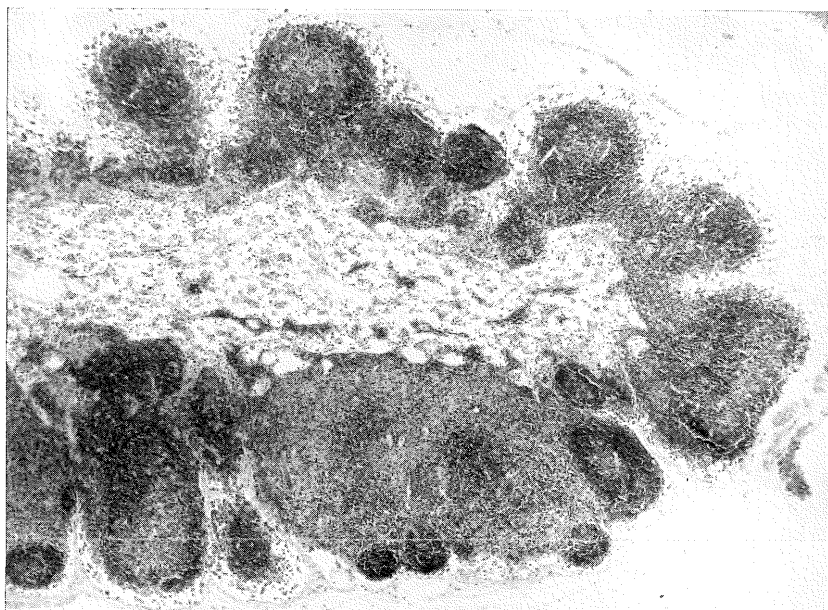


Fig. 2. Popliteale lymphklier konijn. Partieel overzicht met lymphocytenvelden, follikels en merggebied. Kl: Methylgroen-pyronine, ¹. Vergr.: 40 ×

dan aan de buitenzijde meerdere follikels bevatten. Naar het merg toe hangen ook deze grotere velden samen met de mergstrengen. De follikels onderscheiden zich door hun structuur duidelijk van de lymphocytenvelden waarin ze gelegen zijn. Terwijl in de lymphocytenvelden een zeer regelmatige verdeling van kleine lymphocyten wordt gevonden, kan men aan de follikels een lichter follikelcentrum onderscheiden, dat omgeven is door een krans van zeer dicht opeengepakte kleine lymphocyten. De follikels met hun centra vormen al bijna sedert een eeuw een onopgelost probleem in de histologie van het lymphoide weefsel. Door FLEMMING zijn al in 1885 beelden beschreven waarbij in de follikelcentra naast celverval en phagocytose van de celresten een actieve celvermenigvuldiging werd gevonden. Op grond hiervan werden de follikels beschouwd als haarden van lymphocytenvorming en kregen de follikelcentra de naam van „Keimzentren” of „germinal centres”. Door HELLMAN is er

¹ Alle volgende afbeeldingen betreffen praeparaten gekleurd met methylgroen-pyronine.

omstreeks 1920 op gewezen, dat celverval en proliferatieve activiteit in de follikelcentra niet *steeds* voorkwamen, maar alleen werden gevonden als reactie op bepaalde schadelijke inwerkingen. Deze onderzoeker verwierp de hypothese, dat deze veranderingen samenhangen met lymphocytenvorming — hij veronderstelde dat het hier ging om antilichaamvorming — en wees daarom de term kiemcentrum af, en noemde de follikelcentra „Reaktionszentren”. Omstreeks 1930 toonde GLIMSTEDT aan dat deze follikelcentra ontbraken in de follikels van pasgeborenen en van bacterie-vrij opgefokte proefdieren. Ook bij volwassenen kan men follikels aantreffen waarin typische follikelcentra (nog?) ontbreken. Doordat men zich noch over de betekenis van de lymphocytenvelden, noch over die van follikels met een follikelcentra een duidelijk beeld heeft kunnen vormen is een bijzonder verwarrende nomenclatuur ontstaan. Follikels zonder een typisch follikelcentrum worden gewoonlijk aangeduid met de termen „Primärknötchen”, „solide Knötchen” of „primary nodules”; follikels met een typisch centrum heten „Sekundärknötchen” of „secondary nodules”. Lymphocytenvelden worden aangeduid als „Rindenknötchen”, „pseudo secondary nodules” of „tertiary nodules” (EHRICH; 1946). In dit proefschrift zullen slechts de namen follikel, follikelcentrum met lymphocytenkrans en lymphocytenveld worden gebruikt.

Het bloedvatenpatroon in de lymphklier is op een zeer bepaalde wijze betrokken in de architectuur van de ophopingen van lymphoïde cellen in schors en merg. Van de arterien, die de lymphklier aan de hilus binnentreden, verlopen alleen de grotere takken in het systeem van bindweefseltrabekels. De kleinere arterievertakkingen doorlopen vervolgens het merg en zijn daarbij vrijwel alle gelegen in mergstrengen, waarvan ze a.h.w. het „skelet” vormen. In deze mergstrengen begeven ze zich naar de schors, waar ze in de lymphocytenvelden tot vlak bij de follikels doordringen. Het zijn vooral de follikels, welke van hieruit worden voorzien met een dicht capillairen-netwerk. Het veneuze bloed van de schors, dat dus voornamelijk van de follikels afkomstig is, wordt afgevoerd door kleine venulen die dóór de lymphocytenvelden weer in de richting van het merg lopen. Ook deze mergvenulen zijn, evenals de mergarteriolen, vrijwel alle gelegen in mergstrengen. Het hele mergstrengensysteem heeft daardoor in zekere zin de arteriolen- en venulen-vertakkingen tot grondslag. Van de venulen, tenslotte, vertonen diegenen welke in de

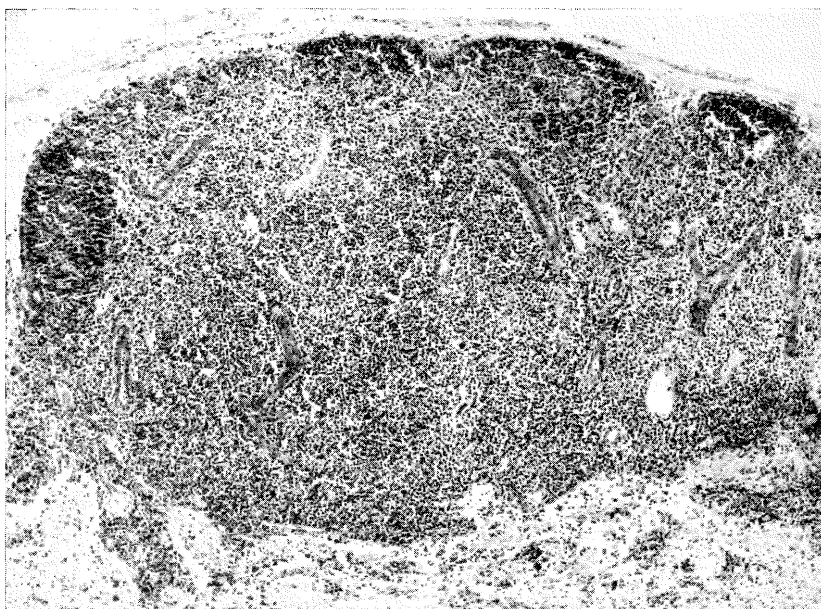


Fig. 3. Lymphocytenveld met enkele karakteristieke „epitheloide” venulen. Vergr.: 80 ×

grotere lymphocytenvelden gelegen zijn (zie fig. 3) nog een bijzonderheid: de endotheelwand bestaat uit sterk gezwollen, vrijwel kubische cellen met een licht pyroninofiel (basofiel) cytoplasma (fig. 4). Tussen deze „epitheloide” endotheelcellen worden vrijwel altijd lymphocyten aangetroffen waarvan in het microscopische beeld niet uit te maken is of ze de bloedbaan verlaten dan wel juist binnentreden. Deze karakteristieke „epitheloide” venulen worden door YOFFEY en COURTICE (1956) aangeduid als post-capillaire stomata.

OVERZICHT VAN DE LITERATUUR BETREFFENDE DE PLASMACELLULAIRE REACTIE IN DE LYMPKLIER

Onderzoekingen over de rol van de plasmacellen bij de antilichaamvorming en het concept van de „plasmacellulaire reactie” — het ontstaan van plasmacellen als reactie op een antigene prikkel — zijn nog maar van betrekkelijk recente datum. Het zijn voornamelijk twee ont-

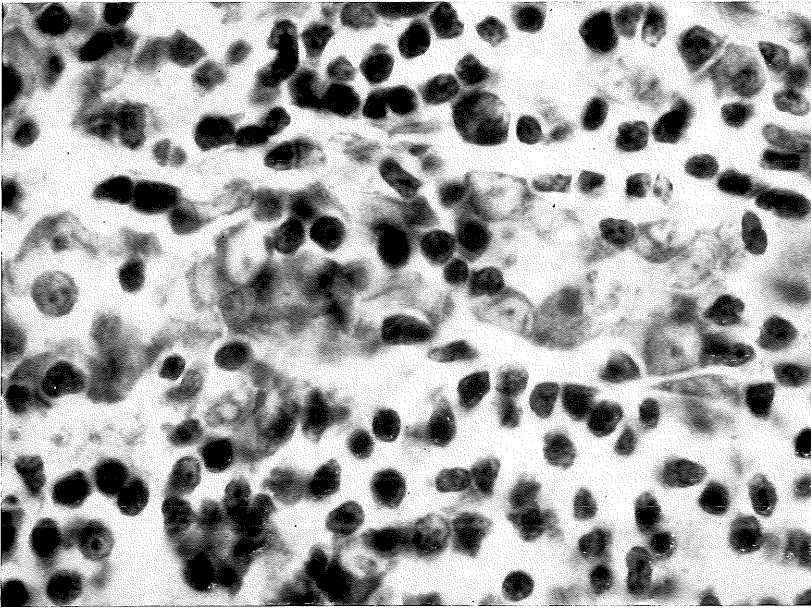


Fig. 4. „Epitheloide” venule uit lymphocytenveld met lymphocyten tussen de gezwollen endotheelcellen. Vergr.: 990 \times .

wikkelingen geweest, die een nieuwe experimentele benadering mogelijk maakten.

In 1939 legde het baanbrekende werk van TISELIUS en KABAT de grondslag voor de herkenning van de antilichamen als zelfstandige eiwitcomponenten van het bloedplasma, de zg. gamma-globulines (en gedeeltelijk ook de bèta-globulines). Al direct werd toen vermoed, dat antilichaamvorming zou betekenen: synthese van deze eiwitten in antwoord op een antigene prikkel.

Tezelfdertijd leerde men door de cytologische onderzoeken van BRACHET (1940) en CASPERSSON (1947) het celbeeld kennen dat, met geringe variaties, kenmerkend is voor eiwitsynthetiserende cellen: het zijn steeds cellen met een intensieve basophilie van het cytoplasma en een heldere celkern waarin een grote, eveneens basophile nucleolus. Basophilie van cytoplasma en nucleolus bleken te berusten op de aanwezigheid van ribonucleoproteinen, waaraan bij de eiwitsynthese een essentiële rol kon worden toegekend.

In verband met deze ontwikkelingen is men in het lymphoïde weefsel min of meer gericht gaan zoeken naar cellen, die cytologisch de kenmerken hadden van eiwitsynthetiserende cellen, als de elementen die mogelijk verantwoordelijk zouden zijn voor de antilichaamvorming. Bij dit onderzoek heeft men vrijwel algemeen gebruik gemaakt van de histologische kleuring, welke ook door BRACHET was toegepast bij zijn werk over eiwitsynthetiserende cellen, de reeds lang bekende kleuring volgens Unna-Pappenheim met methylgroen-pyronine. Beide kleurstoffen worden onder bepaalde omstandigheden specifiek opgenomen door nucleoproteïnen, het methylgroen door de deoxyribosenucleoproteïnen van de celkern (chromatine) en het pyronine door de ribosenucleoproteïnen van cytoplasma en nucleolus.

Door BING en PLUM (1937) werd in plasmacelleninfiltraten, ontstaan in perirenaal vetweefsel (!) na hyperimmunisatie, een zeer hoog gehalte aan antilichamen gevonden. Deze waarneming vormde de eerste sterke aanwijzing, dat plasmacellen betrokken zouden zijn bij de vorming van antilichaam. Plasmacellen bezitten een bijzonder intensief basophil (pyroninophil) cytoplasma.

BJØRNEBOE en GORMSEN (1943) trachtten vervolgens het verband aan te tonen tussen de stijging van het antilichaameiwit in het bloedplasma en de toename van het aantal plasmacellen in het lymphoïde weefsel van konijnen tijdens hyperimmunisatie d.w.z. na multipale intraveneuze antigeeninjecties. In lymphklieren werd hierbij alleen in de mergstrengen een groot aantal prolifererende plasmacellen gevonden. In feite is dit de eerste waarneming geweest betreffende de localisatie van de plasmacellulaire reactie in het lymphoïde weefsel.

Door FAGRAEUS (1948) is daarna op overtuigende wijze de correlatie aangetoond tussen de aanwezigheid van nieuw ontstane plasmacellenconglomeraten in de lymphoïde organen en antilichaamvorming in weefselculturen van deze organen. Bij deze proeven werden konijnen voorbehandeld met twee subcutane injecties van het betreffende antigeen. (*Salmonella typhi* of paardenserum); na een derde, intraveneuze (!), injectie werden op verschillende tijdstippen de lymphoïde organen histologisch onderzocht met de methylgroen-pyronine kleuring en tegelijkertijd in weefselculturen van dezelfde organen de antilichaamvorming gemeten. In de weefselculturen van de milt, die in deze proeven steeds de sterkste antilichaamvorming vertoonde (intraveneuze antigeeninjectie!),

werd deze antilichaamvorming alleen gevonden in culturen van de rode miltpulpa; culturen van follikels uit de witte pulpa gaven geen productie van antilichamen te zien. Histologisch waren plasmacellen ook alleen in de rode pulpa gelocaliseerd en wel in grote agglomeraten.

Het bleek dat deze plasmacellen na de antigeeninjectie *nieuw* ontstonden. Dit door FAGRAEUS als „plasmacellulaire reactie” beschreven proces verloopt als volgt. Na 1 à 2 dagen verschijnen als eersten grote stamcellen met een smalle zoom matig pyroninofiel (basofiel) cytoplasma, een grote, lichte celkern en een duidelijke nucleolus, door FAGRAEUS „transitional cells” genoemd. Hieruit ontstaan „plasmablasten”, grote blast-type cellen met een gelijkmatig, sterk pyroninofiel cytoplasma en een heldere kern waarin een grote, eveneens pyroninofiele, nucleolus. Deze laatste cellen ontwikkelen zich tot „onrijpe plasmacellen” die zich van de plasmablasten onderscheiden door een excentrische ligging van de celkern en het verschijnen van de voor plasmacellen kenmerkende halo in het cytoplasma — de plaats van het Golgi-apparaat. Deze onrijpe elementen van de plasmocytaire reeks hebben dus allen het typische celbeeld van eiwitsynthetiserende cellen. De verdere differentiatie tot de bekende rijpe plasmacellen heeft plaats door een progressieve condensatie van het kernchromatine en een geleidelijke grootte-afname van de hele cel. De nucleolus verdwijnt hierbij of wordt althans onzichtbaar. Tijdens de eerste fases van dit differentiatieproces heeft een sterke mitotische vermeerdering van de jonge plasmacellen plaats.

Het bleek verder, dat de maximale antilichaamvorming correspondeerde met de aanwezigheid van voornamelijk onrijpe plasmacellen. Op deze grond werd geconcludeerd dat de rijpe plasmacellen, hoewel nog zeer veel antilichamen bevattende, zelf nauwelijks meer antilichamen synthetiseerden. In de lymphklieren werden plasmacellulaire reacties bij deze proeven alleen gevonden bij gebruik van paardenserum als antigeen. In de mergstrengen verschenen twee dagen na de laatste (I.V.) antigeeninjectie „transitional cells” die zich ter plaatse in de loop van drie dagen ontwikkelden via onrijpe tot rijpe plasmacellen. Bij zeer heftige reacties werden ook plasmacellulaire elementen waargenomen in de schors langs de „cortical sinuses”. Evenals in de milt vond FAGRAEUS ook hier duidelijk vergrote follikels, zonder dat daarin evenwel een ontwikkeling van plasmacellen werd waargenomen. Opgemerkt kan nog worden, dat in de

thymus noch een plasmacellulaire reactie, noch antilichaamvorming kon worden aangetoond.

Meer in het bijzonder op de lymphklier gericht was het onderzoek van RINGERTS en ADAMSON (1950). Deze onderzoekers trachtten experimenteel het beeld na te bootsen van een „niet specifieke lymphadenitis”, zoals zij die vaak zagen bij menselijk autopsie of biopsie materiaal. Caviae werden om de twee of drie dagen subcutaan ingespoten met bacteriële antigenen van uiteenlopende soort. Gedurende de periode van deze antigeeninjecties en gedurende een zekere tijd daarna werd het histologische beeld van de regionale lymphklier vervolgd met behulp van de methylgroen-pyronine kleuring. De eerste tekenen van de plasmacellulaire reactie werden altijd gezien in de mergstrengen, gewoonlijk tussen 48 uur en 6 dagen na de eerste antigeeninjectie; slechts in één enkel geval werden onrijpe plasmacellen reeds binnen 24 uur waargenomen. De eerste manifestatie van de plasmacellulaire reactie bestond uit het verschijnen van „transitional cells”, die zich daarna ontwikkelden tot rijpe plasmacellen. Gedurende de periode van de herhaalde antigeeninjecties kwamen steeds meer plasmacellen tot ontwikkeling, waarbij het proces van de plasmacelvorming zich in enkele gevallen ook naar de schors uitbreidde. De follikels vertoonden tijdens deze proeven de typische follikelcentrumreacties, waarbij zowel desintegratie van cellen als mitotische activiteit van onrijpe lymphocyten werden gevonden. Deze follikelcentrumreacties werden beschouwd als uitingen van de normale cyclus van veranderingen in de follikelcentra, zoals beschreven door CONWAY (1936). Het viel hun wel op, dat een grote activiteit van deze reacties bleef bestaan gedurende een hele periode van antigeeninjecties en pas daarna verzwakte. Na het staken van de antigeentoediening verdwenen de plasmacellen uit de schors, maar in de mergstrengen handhaafden ze zich nog gedurende lange tijd.

In 1949 publiceerden twee groepen van onderzoekers nl. EHRICH, DRABKIN en FOREMAN, en HARRIS en HARRIS de resultaten van twee nagenoeg identieke onderzoeken nl. over de localisatie van de plasmacellulaire reactie in de popliteale lymphklier van het konijn na subcutane injectie van het antigeen in de achterpoot. Gedurende 6 dagen volgende op de antigeentoediening werd het histologische beeld van de popliteale lymphklier vervolgd met behulp van de methylgroen-pyronine kleuring. De interpretatie van de gevonden histologische beelden door de beide

groepen was totaal verschillend. EHRICH en medewerkers zagen 24 uur na toediening van het antigeen veel „immature pyroninophilic lymphoid cells” in de mergstrengen en aan de mergzijde van de lymphocytenvelden. Op de tweede en derde dag waren deze cellen sterk in aantal toegenomen, terwijl gedurende de daaropvolgende dagen een differentiatie tot rijpe plasmacellen plaats vond. In de schors, d.w.z. in de overige delen der lymphocytenvelden en in de follikels, werden pyroninophile lymphoïde cellen door hen pas waargenomen op de derde dag. Zij menen dat de pyroninophilie van deze cellen minder intensief was dan die van de onrijpe plasmacellen in de mergstrengen. Op de vierde dag vonden zij deze pyroninophile lymphoïde cellen over het hele lymphocytenveld verspreid, terwijl de follikels het beeld van jonge „germinal centres” vertoonden. De door hen waargenomen afname van het aantal dezer pyroninophile cellen in de lymphocytenvelden gedurende de volgende dagen interpreteren zij als een snelle differentiatie van deze elementen tot lymphocyten. In de follikels werden daarbij de latere stadia van de follikelcentrum-reactie gevonden met de bekende tekenen van celverval, zoals vrijliggend en gefagocyteerd pyroninofiel materiaal, en een geleidelijke afname van het aantal middelgrote lymphocyten en lymphoblasten. HARRIS en HARRIS deden hun eerste waarneming pas twee dagen na de antigeen-toediening. Zij beschrijven op dat moment het ontstaan van grote pyroninophile cellen in de lymphocytenvelden van de lymphklier. In de verdere ontwikkeling van deze cellen menen zij een differentiatie tot lymphocyten te zien; het ontstaan van plasmacellen werd door hen noch in de schors noch in de mergstrengen waargenomen.

LEDUC, COONS en CONOLLY (1955) tenslotte onderzochten de plasmacellulaire reactie in de popliteale lymphklier van het konijn met behulp van de door hen ontwikkelde „fluorescent antibody technique”. Deze techniek werd hierbij zo uitgevoerd dat in de cellen aanwezige *antilichamen* werden aangetoond. De lymphklieren werden onderzocht zowel na een enkele antigeeninjectie („primary response”) als na een tweede injectie, 4 tot 6 weken na de eerste gegeven („secondary response”). Als antigenen werden gebruikt diphtherie toxoïed, ei-albumine en menselijk gammaglobuline. Gedurende de „primary response” werden antilichaambe-vattende cellen eerst waargenomen 4 dagen na de antigeentoediening. Het betrof hier slechts zeer kleine aantallen grote cellen met een smalle zoom van zwak tot matig fluorescerend cytoplasma, verspreid liggend

aan de mergzijde van de kleine lymphocytenvelden of in de mergstrengen. Enige dagen later was het aantal antilichaambevattende cellen iets groter en waren sommige van hen reeds te herkennen als rijpe plasmacellen. Tijdens de „secondary response” werden op de tweede dag na de antigeentoediening weer dezelfde onrijpe antilichaambevattende cellen waargenomen maar nu in veel grotere aantallen. De localisatie was in de lymphocytenvelden aan de mergzijde van de follikel en in de mergstrengen. In de corresponderende preparaten gekleurd met methylgroen-pyronine werden grote cellen met pyroninofiel cytoplasma en een heldere kern met 1 of 2 pyroninofiele nucleoli gevonden; mitosen werden dikwijls aangetroffen. Na enkele dagen, waarin deze cellen zich nog actief vermenigvuldigden, waren ze duidelijk herkenbaar als onrijpe plasmacellen en later als rijpe plasmacellen. Slechts bij uitzondering werden in de follikels fluorescerende, d.w.z. antilichaambevattende cellen waargenomen.

Een duidelijk beeld van het verloop der plasmacellulaire reactie in de lymphklier komt uit de genoemde onderzoeken niet naar voren. De proeven van BING en PLUM, BJØRNEBOE en GORMSEN, RINGERTS en ADAMSON gaan duidelijk mank aan het feit, dat meerdere antigeeninjecties werden gegeven, waardoor het proces van de histogenese der plasmacellulaire reactie wordt gecompliceerd. Voorts werd niet steeds rekening gehouden met het feit dat na subcutane injectie de plasmacellulaire reactie in de eerste plaats zal optreden in de regionale lymphklier, na intraveneuze injectie in de eerste plaats in de milt. Bij de onderzoeken van EHRICH c.s. en HARRIS c.s. werd aan deze voorwaarden wel voldaan maar bij de interpretatie van de histologische lymphklierbeelden gaan deze onderzoekers er klaarblijkelijk van uit dat in de lymphocytenvelden van de schors een diffuse lymphocytopoiese plaats heeft, waardoor zij de zich daar mogelijk afspelende onderdelen van de plasmacellulaire reactie niet als zodanig hebben herkend.

Wat de follikels betreft, kan men bij alle genoemde onderzoekers opmerken, dat de zich in de follikels afspelende reacties niet voldoende zijn onderzocht in hun relatie tot de plasmacellulaire reactie. Tegen de oude opvatting van HELLMANN, dat de antilichaamvorming gelocaliseerd zou zijn in de follikelcentra, pleit wel heel sterk de afwezigheid van aantoonbare antilichaamvorming in weefselcultures van follikels uit de milt

(FAGRAEUS) en de afwezigheid van typische fluorescerende cellen in de follikels van de lymphklier (LEDUC, COONS en CONOLLY). Of in een later stadium de follikelcentra toch in de antilichaamvorming betrokken zijn is vooralsnog niet uit te maken.

In het onderzoek, dat in dit proefschrift zal worden beschreven, is getracht, door bovengenoemde storende omstandigheden zoveel mogelijk uit te schakelen, een nauwkeurig beeld op te bouwen, microscopisch en functioneel, van de plasmacellulaire reactie in de popliteale lymphklier van het konijn.

HOOFDSTUK II

ONDERZOEK NAAR DE HISTOLOGISCHE VERANDERINGEN, IN HET BIJZONDER DE PLASMACELLULAIRE REACTIE, IN DE LYMPHKLIER NA ANTIGEENTOEDIENING

MATERIAAL EN METHODEN

Proefdieren.

Gebruikt werden Chinchilla en Goud-Agouti konijnen, resp. uit eigen fok en betrokken van het Centraal Proefdierenbedrijf T.N.O., met een leeftijd van ongeveer 6 maanden en een gewicht van 2—3 kg. De dieren waren van tevoren niet voor andere proeven gebruikt. Aan de conditie en verzorging der proefdieren werden hoge eisen gesteld, omdat eventuele infecties het beeld van de lymphklier aanzienlijk zouden kunnen beïnvloeden door „spontane” plasmacellulaire reacties.

Antigenen.

Als antigenen werden gebruikt een paratyphus B(H)-vaccin en paarden gamma-globuline. Het paratyphus vaccin bestond uit met formol gedode Salmonella Paratyphi B bacteriën, rijk aan H antigeen. Het aantal bacteriën bedroeg 5×10^9 /ml. De dosering was 0,1 of 0,2 ml., hetgeen bij elke proef afzonderlijk wordt vermeld. Het paarden gamma-globuline (PGG) werd bereid volgens een enigszins gewijzigde methode van MAJOOR (1947) door uitzouting met natriumsulfaat bij een concentratie van 14 g./L. ($3 \times$), gevolgd door dialyse en lyophilisatie. De dosering was 5 mg, opgelost in 0,5 ml. fysiologisch zout. Het antigeen werd subcutaan tussen de tibia en de achillespees, vlak boven het enkelgewricht ingespoten.

Bloedserum.

Door middel van hartpunctie werd per keer 2—5 ml. bloed afgenomen onder zo steriel mogelijke omstandigheden. Na stolling, gedurende ongeveer twaalf uur bij kamer-temperatuur, werd gecentrifugeerd, het serum afgezogen en bewaard bij $+4^\circ$ Celsius.

Bepaling van de antilichaamtiter.

De antilichamen tegen het paratyphus B (H) antigeen werden bepaald

door middel van de agglutinatiereactie met FICKER-suspensie (H antigeen). Het serum werd verdund in een halverings reeks. Het nummer van het buisje, waarin nog agglutinatie waarneembaar is, is dan de 2^{\log} titer van het betreffende serum. De antilichamen tegen PGG werden bepaald met de haemagglutinatie techniek volgens STAVITSKY (1954), waarbij op dezelfde wijze een verdunningsreeks van het serum werd gemaakt, en aan de serumverduunningen getanneerde, en met antigeen behandelde schapen-erythrocyten werden toegevoegd.

Het wegnemen van popliteale lymphklier, milt en beenmerg.

Alle operatieve ingrepen werden zo steriel mogelijk uitgevoerd. Als narcosemiddel diende Veterinair Nembutal (concentratie 60 mg/ml), intraveneus toegediend in een dosering van 0,5 ml per kg lichaamsgegewicht. De popliteale lymphklier werd meestal in zijn geheel weggenomen. Van de milt werd slechts een stukje van ongeveer 1 cm lengte gebruikt. Indien weefsels moesten worden weggenomen om te worden gekweekt, dan werd het dier gedood door verbloeding, nadat tevoren 1 ml heparine was ingespoten, waardoor bloed met daarin aanwezige antilichamen beter uit de geprepareerde weefselstukjes kon worden gewegwassen. Het beenmerg was steeds afkomstig uit de hals van het femur.

Histologische techniek.

Het weefsel werd gefixeerd in een mengsel van ZENKER-oplossing (90 ml) + formol 33% (5 ml) + trichloorazijnzuur 2% (5 ml) onder voortdurend bewegen gedurende precies vijf uur. Van elk weefselstuk werd een aaneensluitende serie paraffinecoupes gesneden. De kleuring geschiedde volgens BRACHET (1953), met methylgroen en pyronine (GEIGY, Zwitserland). De chloroformbehandeling van de kleurstof methylgroen werd achterwege gelaten.

Weefselculturen.

De steriel weggenomen weefsels werden apart in een petrischaal opgevangen en zo goed mogelijk van het omgevend weefsel ontdaan. Het weefsel werd in een druppel cultuurmedium (15 ml HANKS-oplossing, 4 ml konijnen serum, 1 ml. Amparon Forte) in kleine stukjes gesneden, en daarna drie maal in vers cultuurmedium gewassen. De

weefselstukjes werden op het oog in twee gelijke hoeveelheden verdeeld en gewogen. De ene helft werd gekweekt in een roller tube bij 37°. Hiertoe werd de wand van een roller tube bevochtigd met konijnen plasma en de weefselstukjes over de wand verdeeld, waarna 2 ml cultuurmedium werd toegevoegd. Na 28 uur kweken werd het weefsel met kwartsmeel fijn gewreven, de cultuurvloeistof uit de roller tube eraan toegevoegd, waarna dit mengsel werd gecentrifugeerd. Van de bovenstaande vloeistof werd de antilichaamtiter bepaald („cultuurtiter”). De andere helft van de weefselstukjes diende ter bepaling van de in het weefsel aanwezige antilichaamtiter. Het materiaal werd hiertoe in 0,1 ml aqua dest. met kwartsmeel fijn gewreven, waarna 0,9 ml aqua dest. en tenslotte 1 ml 2% NaCl oplossing werd toegevoegd. Na afcentrifugeren werd ook van deze bovenstaande vloeistof de antilichaamtiter bepaald („extracttiter”). Het konijnen serum, dat in het cultuurmedium werd gebruikt, en het konijnen plasma werden steeds op de afwezigheid van antilichamen gecontroleerd.

Bepaling van de productiecijfers.

De hoeveelheid antilichamen werd uitgedrukt in arbitraire eenheden, te weten de titerwaarde. De hoeveelheid geproduceerde antilichamen, uitgedrukt in deze eenheden, is dan het verschil tussen het gehalte van de cultuur en het gehalte van het extract. Deze productie werd steeds omgerekend op 100 mg weefsel.

Voorbeeld: Bij een cultuurtiter van 16 (hoogste verdunning waarin nog agglutinatie — 1 : 16) en een extracttiter van 2 voor een weefselstukje van 34 mg, bedraagt de antilichaamproductie $16 - 2 = 14$ eenheden, omgerekend voor 100 mg weefsel is dit $100/34 \times 14 = 41$ eenheden.

MICROSCOPISCH ONDERZOEK VAN DE NORMALE LYMPHKLIER VAN HET KONIJN

Voor het onderzoek van de normale lymphklier van het konijn stonden een 50-tal popliteale lymphklieren ter beschikking — allen uit de rechter achterpoot —, welke als controles werden weggenomen vóórdát in de linker achterpoot antigeen werd ingespoten ter bestudering van de histologische veranderingen in de linker politeale lymphklier. Het microscopische beeld van een dergelijke controle-lymphklier is weergegeven in

fig. 2, pag. 6. In algemene bouw kwamen deze lymphklieren geheel overeen met de beschrijving zoals deze in hoofdstuk I is gegeven. Naast de popliteale lymphklieren werd van een aantal normale dieren ook de mesenteriale lymphklier onderzocht.

Op een drietal punten leverde het onderzoek van de normale lymphklieren gegevens op, die een aparte vermelding rechtvaardigen in verband met de resultaten van de uitgevoerde experimenten.

In de normale popliteale lymphklier werden altijd rijpe plasmacellen gevonden. Het aantal hiervan was wisselend maar, op een enkele uitzondering na, niet groot. Deze rijpe plasmacellen waren vrijwel steeds uitsluitend in de *mergstrengen* gelocaliseerd. Een enkele maal, wanneer het aantal plasmacellen relatief groot was, konden ze ook worden aangetroffen aan de mergzijde van de follikels in kleinere lymphocytenvelden die, als beschreven, direct op mergstrengen aansluiten. In sporadische gevallen werd een aantal cellen waargenomen, die op grond van de verdere waarnemingen als plasmablasten of onrijpe plasmacellen konden worden beschouwd; deze cellen lagen dan verspreid in de lymphocytenvelden. Deze lymphklieren, welke dus een „spontane” plasmacellulaire reactie vertoonden, werden door ons als niet normaal geclassificeerd: het betreffende dier werd bij de verdere waarnemingen buiten beschouwing gelaten.

De follikels in de normale popliteale lymphklieren bleken een verrassend constante bouw te vertonen. Met name hadden de follikelcentra constant een *indifferent* aspect. Follikels waarvan de centra een reactie vertoonden („Keimzentren”-FLEMMING of „Reaktionszentren”-HELLMAN) werden onder normale omstandigheden niet aangetroffen. Voor het beeld van de normale follikel kan verwezen worden naar fig. 7 op pag. 25. De centra in deze follikels vallen in het histologische preparaat op door hun lichte kleuring, wat samenhangt met het overwegen van indifferente (niet phagocyterende) reticulumcellen. Tussen deze reticulumcellen liggen verspreid een gering aantal kleine lymphocyten. Alleen aan de naar het merg toegekeerde zijde liggen in deze centra gewoonlijk een groepje „medium-sized” lymphocyten met soms een enkele blast-type cel, een zg. „large lymphocyte” (vgl. MAXIMOW & BLOOM; 1957). Sporadisch kan in deze cellen een mitose voorkomen.

Indien deze „large” en „medium-sized” lymphocyten als stamcellen resp. jeugdvormen van de kleine lymphocyten mogen worden beschouwd, zoals meestal wordt aangenomen, dan wijst het constant voorkomen van deze indifferente centra in de normale lymphklier op een slechts minimale lymphocytopoetische activiteit van de follikels. Voorts ontbrak in onze waarnemingen ieder aanknopingspunt voor het voorkomen van cyclische veranderingen van de follikelcentra in de normale lymphklier, zoals dat veelal wordt aangenomen op grond van het werk van CONWAY (1937) en MAXIMOW (1927), twee onderzoekingen overigens, die gebaseerd zijn op niet-normale (!) lymphklieren.

Ook in de lymphocytenvelden werd nooit enig teken van lymphocytopoetische activiteit waargenomen. In de sporadische gevallen waarin blast-type cellen — zogenaamde (!) „large lymphocytes” — in de lymphocytenvelden voorkwamen, waarbij dan gewoonlijk ook enkele mitosen van deze cellen werden gevonden, was het op grond van de experimentele waarnemingen van dit onderzoek duidelijk, dat het hier een „spontane” plasmacellulaire reactie betrof. Deze kunnen een gevolg zijn van algemene infecties; vaker vinden ze hun oorzaak in lichte verwondingen aan de achterpoten, die bij sommige konijnen, vooral wanneer de hokken van metalen bodemroosters zijn voorzien, kunnen voorkomen.

Twee andere waarnemingen zijn in verband met het probleem van de eventuele lymphocytopoiese in de lymphocytenvelden van belang. In de grote lymphocytenvelden, zoals afgebeeld in fig 3, pag. 8, werden steeds de typische „epitheloide”venulen aangetroffen met hun karakteristieke wand van gezwollen, bijna kubische endotheelcellen. In fig. 4, pag. 9, een sterkere vergroting van een dergelijke venule, kan men tussen deze endotheelcellen duidelijk de lymphocyten waarnemen, die klaarblijkelijk hetzij uit de bloedbaan naar het lymphocytenveld, hetzij omgekeerd uit het veld in de bloedbaan migreren. Aangezien in het verdere verloop van deze venulen, mergwaarts, vrijwel nooit lymphocyten in het lumen worden aangetroffen, wat in het laatste geval te verwachten zou zijn, lijkt het waarschijnlijk dat het hier om een emigratie van lymphocyten uit de bloedbaan gaat.

Een tegenhanger hiervan is een proces, dat afgebeeld is in fig. 5., een sterkere vergroting van het midden-boven gebied uit fig. 2. In deze afbeelding is in het centrum een gebied te zien dat qua structuur een

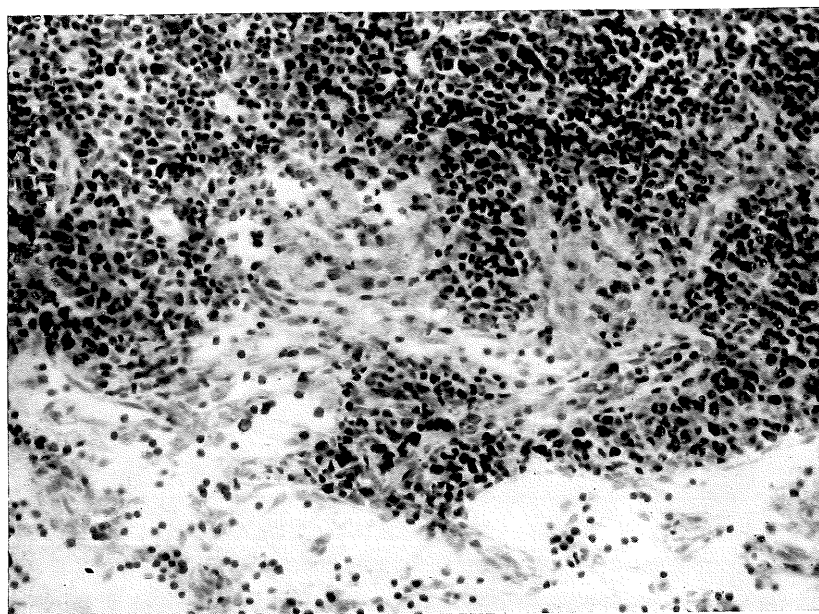


Fig. 5. Sterkere vergroting uit fig. 2, van het midden gebied boven. „Openbrekend” lymphocytenveld, overgaand in merggebied. Vergr.: 300 \times .

overgang vormt tussen lymphocytenveld en mergsinus. Dergelijke gebieden zijn altijd in de normale zowel als de experimentele lymphklieren waar te nemen in zeer verschillende stadia van ontwikkeling. Ze komen o.a. ook voor in de fig. 11, 12, 22, 23, 26, 27 en 28 uit de experimentele series. In deze gebieden heeft klaarblijkelijk een omvorming plaats van een lymphocytenveld in een merggebied d.w.z. in mergstrengen en mergsinussen. In dergelijke door ons als „openbrekende” lymphocytenvelden aangeduide gebieden lost het grondpatroon van reticulumcellen zich op, doordat het reticulaire celverband verloren gaat. Hierbij ontstaan holten, sinussen, waarin slechts een ijl netwerk van reticulumcellen overblijft en waarbij vele afgeronde reticulumcellen — macrophagen, monocyt? — en vooral grote aantallen kleinere lymphocyten vrij in de nieuw ontstane sinus komen te liggen. Aangenomen mag worden dat deze cellen met de lymfe via de mergsinussen en efferente lymphebaan worden afgevoerd. Tussen de zo ontstane sinussen blijven strengen van lymphoid weefsel over rondom de arteriolen en venulen. Het gevolg is, dat een

merggebied met mergstrengen en mergsinussen ontstaat op de plaats van een tevoren aanwezig lymphocytenveld. Resten van het oorspronkelijke veld blijven over als mergstrengen en als de *kleine*, om de randstandige follikels gelegen, lymphocytenvelden. Er kan weinig twijfel bestaan of dit proces, dat dus enerzijds bij voortduring (!) ingrijpende veranderingen in de bouw van de lymphklier doet ontstaan, is anderzijds een wijze waarop lymphocyten uit de lymphklier in circulatie geraken.

Uit het onderzoek van de mesenteriale lymphklieren, tenslotte, bleek dat het microscopische beeld van deze klieren in belangrijke mate afwijkt van dat van de normale popliteale lymphklieren. Op grond van de verdere experimentele waarnemingen betreffende veranderingen in de popliteale lymphklieren na antigeentoediening kon worden geconstateerd dat de „normale” mesenteriale lymphklier steeds de beelden vertoont, welke in de popliteale lymphklier na antigeentoediening worden gevonden. Voortdurend spelen zich in de mesenteriale lymphklieren sterke plasma-cellulaire reacties af. Aangenomen mag worden dat deze een gevolg zijn van een voortdurende aanvoer van antigenen uit het darmkanaal. Op de betekenis van deze waarneming zal in het laatste hoofdstuk nog nader worden ingegaan. Hier moge al vermeld worden dat de mesenteriale lymphklier op grond van onze waarnemingen *niet* als representatief beschouwd mag worden voor de normale lymphklier; een feit waarmee tot nu toe nauwelijks enige rekening is gehouden en waardoor op essentiële punten foutieve gevolgtrekkingen zijn gemaakt (zie o.a. YOFFEY, HANKS, KELLY; 1958).

Uit deze waarnemingen bij normale lymphklieren blijkt wel de grote betekenis van een goede conditie, resp. goede verzorging van proefdieren, welke in experimenten betreffende het lymphoïde systeem zullen worden gebruikt. Het is bij dergelijke experimenten verder noodzakelijk om adequate controle-proeven uit te voeren, die een indruk geven van de „normale” toestand van het lymphoïde apparaat.

DE „PRIMARY RESPONSE” VAN DE LYMPHKLIER OP PARATYPHUS-B VACCIN

De histologische veranderingen in de lymphklier.

Gedurende 6 dagen na subcutane antigeentoediening werden de ver-

anderingen in de regionale lymphklier vervolgd in samenhang met het verloop van de antilichaamtiter in het bloed. Bij 14 konijnen werd 0,1 ml paratyphus B (H) vaccin subcutaan in de linker achterpoot ingespoten. Van deze konijnen dienden 2 als titercontroles; bij deze dieren werd dagelijks de antilichaamtiter in het bloedserum bepaald. Van de overige 12 konijnen werd 1, 2, 3, 4, 5 resp. 6×24 uur na de antigeeninjectie bij telkens twee konijnen de linker popliteale lymphklier weggenomen voor histologisch onderzoek; de serumtiter werd bij deze dieren alleen bepaald vóór de antigeentoediening en op het moment dat de lymphklier werd weggenomen. Als controle op de histologische veranderingen in deze lymphklieren dienden de rechter popliteale lymphklieren, welke steeds vlak vóór de antigeentoediening waren weggenomen.

Het verloop van de *antilichaamtiter*s vormt als het ware de achtergrond waartegen men de histologische veranderingen in de lymphklieren moet beschouwen. Het resultaat van de titerbepalingen is weergegeven in fig. 6. De getrokken lijn in deze figuur toont het verloop van de serumtiter van één der beide titercontroles. Het andere dier bleek reeds op de 0e dag een antilichaamtiter te vertonen en was daardoor onbruikbaar. De open cirkeltjes vertegenwoordigen de antilichaamtiter van de overige 12 dieren op het moment dat de linker popliteale lymphklier werd weggenomen. Deze waarnemingen tonen duidelijk aan, dat het titerverloop bij deze dieren behoorlijk overeenstemt met dat van het titercontrole dier. Een uitzondering hierop vormt één waarneming op de vierde dag, waarbij geen serumtiter werd gevonden; in de lymphklier werden in dit geval ook geen histologische veranderingen aangetroffen.

Uit de figuur blijkt dat de inductie-periode, d.w.z. de tijd tussen de antigeentoediening en het verschijnen van antilichamen in het bloedserum, bijna drie dagen bedroeg. Daarna werd een sterke stijging van de serumtiter gevonden terwijl de maximale serumtiter werd bereikt omstreeks de zesde dag. Wanneer men bedenkt, dat deze titers logaritmisch zijn uitgezet, dan blijkt uit deze waarnemingen dat de sterkste afgifte (secretie) van antilichamen plaats vindt tussen de vierde en de zesde dag na de antigeentoediening.

Bij het *microscopisch onderzoek* werd reeds in beide gevallen, waarin de linker popliteale lymphklier 24 uur na antigeentoediening werd wegge-

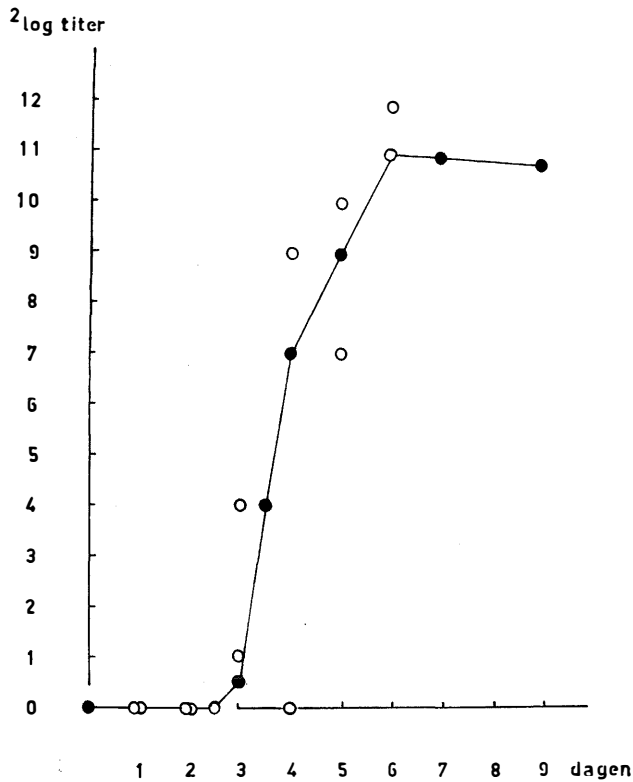


Fig. 6. „Primary response”, paratyphus vaccin.
Verloop van de antilichaamtiter in bloedserum.

nomen, in deze lymphklieren een, zij het gering, aantal grote pyroninophile cellen aangetroffen, gelegen aan de bases van de follikels. Het betrof hier zowel follikels, welke in de kleinere, als die, welke aan de rand van de grote lymphocytenvelden lagen. In fig. 7 is een dergelijke follikel, gelegen aan de rand van een lymphocytenveld, bij overzichtsvergroting afgebeeld. De betreffende cellen zijn bij deze vergroting nauwelijks te onderscheiden. In fig. 8 echter is de basis van deze zelfde follikel met sterkere vergroting weergegeven en hier zijn deze cellen en hun ligging temidden van kleine lymphocyten duidelijk te zien. Het donkere, in het gekleurde beeld sterk pyroninophile, cytoplasma van deze elementen



Fig. 7. „Primary response”, paratyphus vaccin; 24 uur na antigeen. Overzicht follikel aan rand van lymfocytenveld; plasmablasten aan basis van follikel moeilijk zichtbaar, zie echter fig. 8; indifferent follikelcentrum. Vergr.: 130 \times .

komt hier goed tot uiting, evenals de grote licht gekleurde celkern waarin de grote nucleoli opvallen. Op grond van de verdere waarnemingen kunnen de cellen herkend worden als de eerst optredende jeugdvormen van de plasmacellen. Volgens de terminologie van FAGRAEUS (verg. pag. 11) moeten deze cellen als „transitional cells”, sommigen reeds als plasmablasten worden geclassificeerd, afhankelijk van de celgrootte en van de sterkte van de pyroninophilie. De hier beschreven localisatie,

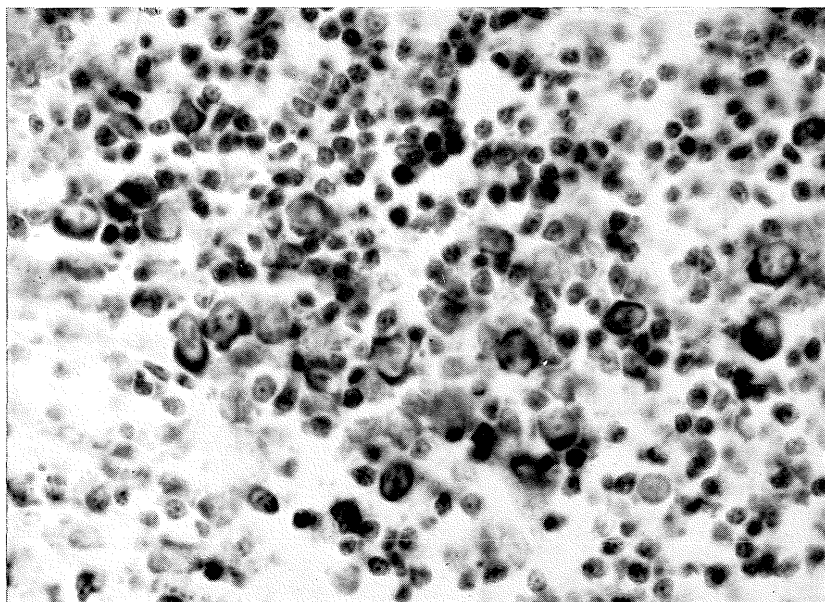


Fig. 8. Basis van de follikel uit fig. 7, echter enige coupes verder; plasmablasten aan basis van follikel. Vergr.: 720 \times .

aan de basis van de follikels, is de enige plaats waar deze cellen in dit stadium in de lymphklier worden aangetroffen. De lymphocytenvelden zelf, de mergstrengen en de sinussen gaven geen verandering te zien in vergelijking met de normale beelden, behalve dat in perifeer gelegen mergsinussen een zeker aantal granulocyten aanwezig was. De follikelcentra vertoonden nog hetzelfde indifferente beeld als beschreven bij de normale controles. Ook dit is in fig. 7 duidelijk te zien.

In de lymphklieren weggenomen na 2×24 uur werden plasmablasten in iets grotere aantallen aangetroffen aan de basis van de follikels, terwijl er ook al enkele verspreid in de lymphocytenvelden voorkwamen (fig. 9). Sporadisch werd een mitose van deze cellen waargenomen. Voor het overige waren in de lymphklieren nog geen veranderingen te zien, behalve dat het totaal aantal lymphocyten iets bleek te zijn toegenomen. De granulocyten, die na 1×24 uur werden waargenomen, waren nu geheel verdwenen.

Na 3×24 uur lagen grote aantallen plasmablasten verspreid over de

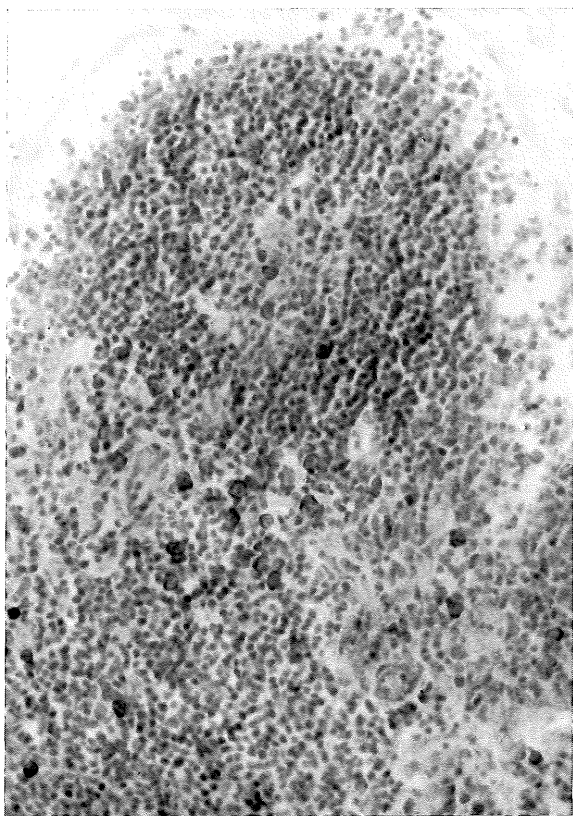


Fig. 9. „Primary response”, paratyphus vaccin; 2×24 uur na antigeen. Plasmablasten in lymphocytenveld aan de basis van de follikel; indifferent follikelcentrum. Vergr.: $250 \times$.

lymphocytenvelden (fig. 10). Een deel van deze cellen vertoonde al een differentiatie tot, wat door FRAGRAEUS genoemd is, onrijpe plasmacellen: cellen waarvan de cytoplasmabasophilie nog is toegenomen en waarbij in dit cytoplasma reeds de uitsparing van de Golgi-zone is te zien, welke zo kenmerkend is voor alle verdere ontwikkelingsstadia van de plasmacel. Meerdere van deze cellen vertoonden mitosen.

Enkele plasmablasten en onrijpe plasmacellen werden nu aangetroffen in mergstrengen grenzend aan de lymphocytenvelden, terwijl ze voor het

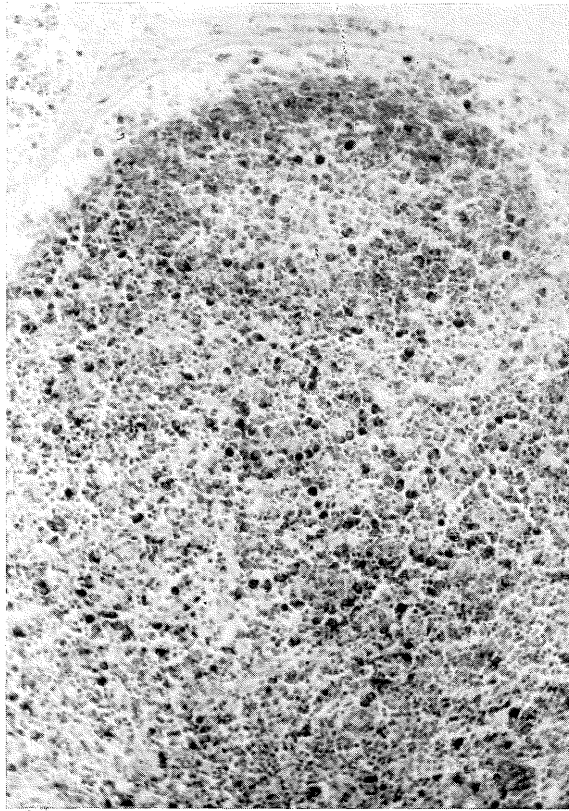


Fig. 10. „Primary response”, paratyphus vaccin; 3 × 24 uur na antigeen. Plasmablasten en onrijpe plasmacellen verspreid over gehele lymphocytenveld; enkele blast-type cellen in overigens indifferent follikelcentrum. Vergr.: 170 ×.

eerst ook verschenen in de mergsinussen. Het verschijnen van deze cellen in sinussen en mergstrengen lijkt tesamen een gevolg te zijn van het proces, dat reeds bij de bespreking van een normale lymphklier is beschreven en dat daar is aangeduid als „openbreken” van de lymphocytenvelden. Leidt dit openbreken in de normale lymphklier tot het ontstaan van slechts lymphocyten bevattende mergstrengen en de verschijning van kleine lymphocyten in de nieuw ontstane sinussen, hier ontstaan uit de lympho-



Fig. 11. „Primary response”, paratyphus vaccin; 3 × 24 uur na antigeen. „Openbrekend” lymphocytenveld; detail zie fig. 12. Vergr.: 130 ×.

cytenvelden met hun grote aantal plasmablasten en onrijpe plasmacellen, mergstrengen, die naast lymphocyten ook plasmablasten en onrijpe plasmacellen bevatten; tegelijkertijd verschijnen in de nieuw gevormde sinussen naast lymphocyten ook grote aantallen van deze plasmocyttaire elementen. Dit proces is in de figuren 11 en 12 in volle gang te zien. In fig. 11 is de ligging van een dergelijk openbrekend gebied duidelijk te zien in zijn localisatie ten opzichte van de follikel. In fig. 12, waar hetzelfde gebied bij sterkere vergroting is afgebeeld, blijken de ontstane sinussen

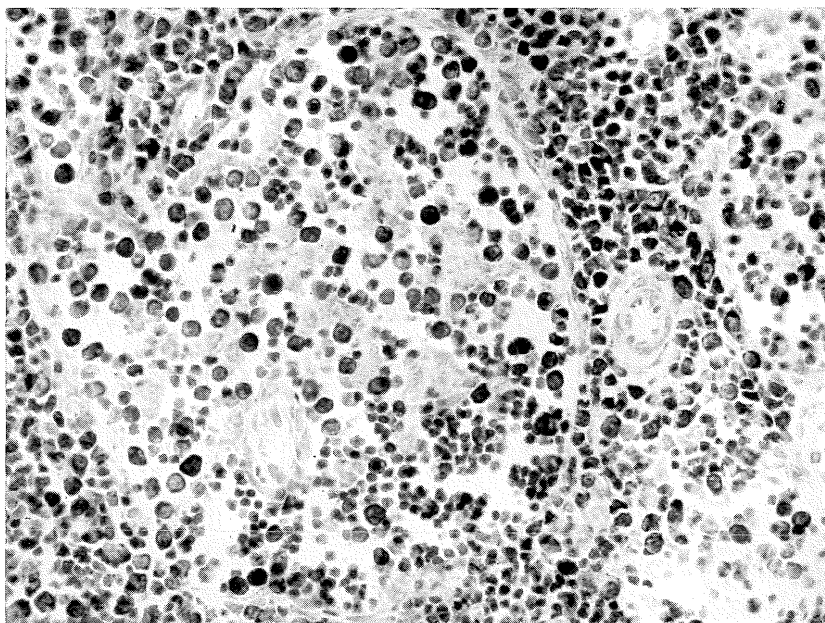


Fig. 12. Sterkere vergroting uit fig. 11, van het middengebied. Plasmablasten en onrijpe plasmacellen in nieuwgevormde mergsinussen en mergstrengen. Vergr.: 360 \times .

en mergstrengen al enigszins te zijn afgegrensd en zijn in beide de lymphocyten en onrijpe plasmacellen waarneembaar. Duidelijk is te zien dat de nieuwe mergstreng zich formeert of, wellicht juister, als rest achterblijft, rondom een arteriole.

Wat de overige veranderingen van de lymphklieren in dit stadium betreft, kan worden opgemerkt, dat nu voor het eerst in de follikelcentra een duidelijke toename van het aantal blast-type cellen werd waargenomen (zie follikel in fig. 11), waarover aanstonds meer. Evenals in het vorige stadium lijkt ook hier het aantal kleine lymphocyten in de lymphklier groter dan normaal.

Vier en twintig uur later, d.w.z. *vier dagen* na de antigeentoediening, was het beeld van de lymphocytenvelden en de mergstrengen vrijwel nog hetzelfde. Tussen de lymphocyten lagen nog vele plasmablasten en onrijpe plasmacellen. Wel was het aantal rijpe plasmacellen in de merg-

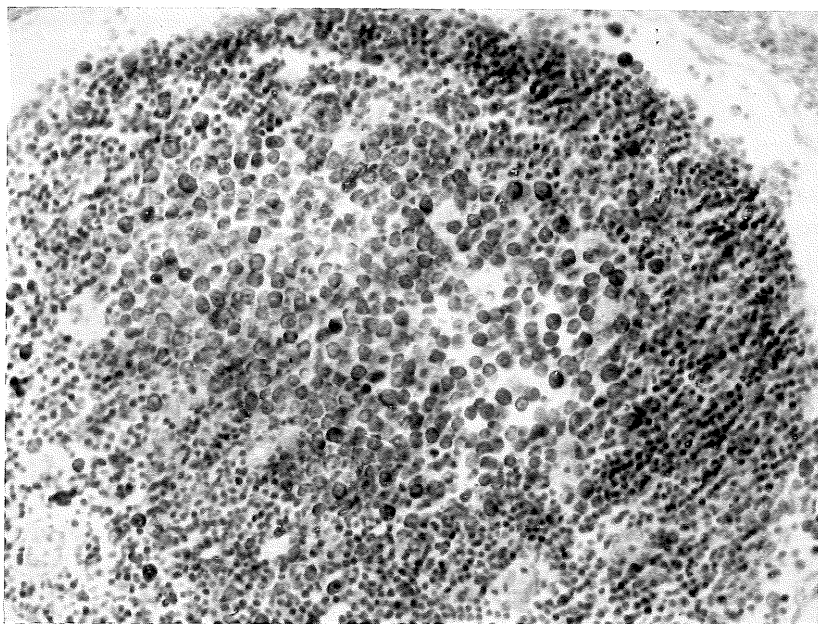


Fig. 13. „Primary response”, paratyphus vaccin; 4 × 24 uur na antigeen. Follikel gevuld met blast-type cellen. Vergr.: 290 ×.

strengen toegenomen. Meerdere van deze pyroninophile cellen waren in mitose. Op verschillende plaatsen werd weer het „openbreken” van de lymphocytenvelden waargenomen waarbij een groot aantal jonge plasmocyttaire elementen in de mergsinussen terecht kwam.

In de follikelcentra waren de blast-type cellen, welke 24 uur eerder reeds in geringe hoeveelheid werden gevonden, sterk in aantal toegenomen. Fig. 13 laat zien hoe een follikelcentrum bijna uitsluitend uit deze cellen bestaat; een beeld dat representatief is voor alle follikels in de betreffende lymphklier. Alhoewel microscopisch géén verschil te zien is tussen deze cellen en de plasmablasten in de lymphocytenvelden, doet het verdere verloop van de reactie veronderstellen dat we in de follikelcentra niet met plasmablasten te doen hebben. Het aantal lymphocyten in de follikelkransen leek evenals in de voorgaande dagen, niet te zijn veranderd.

Na vijf dagen bleek het hoogtepunt van de plasmacellulaire reactie voorbij te zijn. In het midden van de lymphocytenvelden waren nog

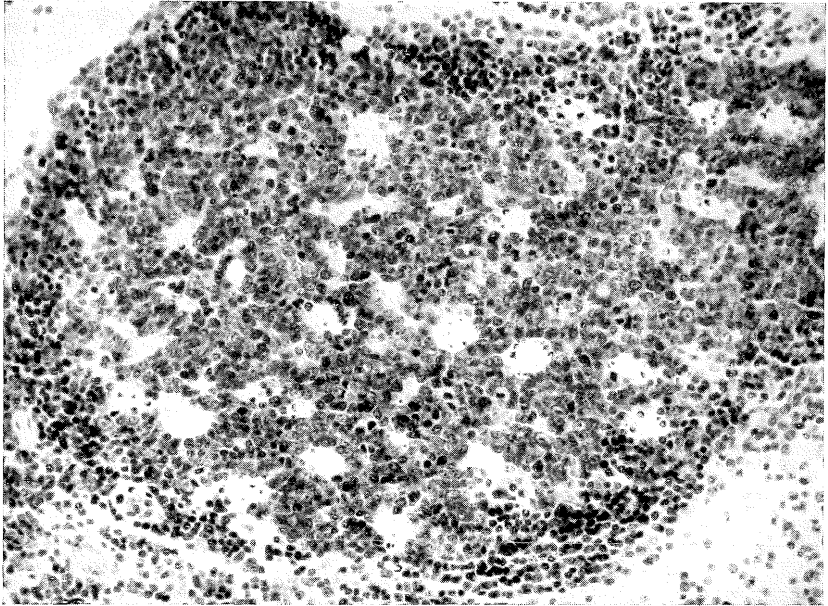


Fig. 14. „Primary response”, paratyphus vaccin; 5 × 24 uur na antigeen. Follikelcentrum met gefagocytierde „tingible Körper” („sterrenhemel beeld”) en „medium-sized” lymphocyten. Vergr.: 280 ×.

slechts enkele plasmablasten en onrijpe plasmacellen te zien. De mergstrengen en de randen van de lymphocytenvelden bevatten nog talrijke plasmablasten en onrijpe plasmacellen, maar hun aantal was duidelijk afgenomen ten gunste van het aantal rijpe plasmacellen. Opvallend was, dat het totale aantal der plasmocytaire elementen, met name van de rijpe plasmacellen, sterk was teruggelopen in vergelijking met de vorige stadia ondanks de daar aanwezige mitotische vermeerdering. Het is duidelijk dat deze afname een gevolg is van het „openbreken” der lymphocytenvelden, waarbij de in de sinussen vrijkomende plasmocytaire cellen met de lymfe worden afgevoerd. Ook in deze lymphklieren was dit „openbreken” der lymphocytenvelden weer te zien, en lag een groot aantal jonge plasmacellen in de mergsinussen.

In de follikelcentra werd nu het karakteristieke beeld gevonden van de follikelcentrum-reactie (vgl. HELLMAN; 1930, pag. 335), zoals in fig. 14 duidelijk is waar te nemen. De blast-type cellen die in het vorige stadium

het centrum bijna geheel vulden, waren nu nog maar in gering aantal aanwezig. „Medium-sized” lymphocyten vormden nu de hoofdcomponent van de follikelcentra ¹. Tussen deze „medium-sized” lymphocyten zijn in fig. 14 een aantal duidelijke uitsparingen te zien, welke gevormd worden door zwak gekleurde reticulumcellen, gevuld met gefagocyteerde kernresten, de „tingibele Körper” van FLEMMING. Deze reticulumcellen geven aan het centrum het typische „sterrenhemelbeeld”. In het centrum zijn voorts vele celdelingen te zien. De lymphocytenkransen om deze groeiende follikelcentra hebben zich al enigszins versmald, vooral aan de mergzijde.

Zes dagen na de antigeeninjectie werden alleen aan de randen van de lymphocytenvelden en in de mergstrengen nog enkele plasmablasten en onrijpe plasmacellen gevonden temidden van een matig aantal rijpe plasmacellen. Toch werden in de mergsinussen nog enige jonge pyroninophile cellen aangetroffen. De follikels vertoonden hetzelfde beeld als in het vorige stadium.

Opgemerkt moet nog worden, dat ook in de *milten* van deze serie proefdieren, welke het antigeen subcutaan toegediend kregen, een lichte plasmacellulaire reactie werd gevonden. Dit zal dus betekenen, dat ook dit orgaan een, zij het vermoedelijk geringe, bijdrage tot de vorming van antilichamen heeft geleverd. Het verloop van deze reactie was geheel zoals onlangs door LANGEVOORT (1961) is beschreven.

De antilichaamproductie in weefselculturen van lymphklier, milt en beenmerg na subcutane antigeentoediening.

Gedurende de eerste zes dagen en op de negende dag na subcutane antigeentoediening werd de antilichaamproductie nagegaan in weefselculturen van de regionale lymphklier, milt en beenmerg. Deze antilichaamproductie werd vergeleken met de antilichaamtiter in het bloed en met de veranderingen in het microscopische beeld van de lymphklier. Als antigeen werd paratyphus-B (H) vaccin gebruikt. 22 Konijnen kregen in *beide* (!) achterpoten een antigeeninjectie van 0,2 ml. Bij twee van deze dieren werd gedurende de dertien volgende dagen het verloop van de

¹ Deze celtypen zijn met hun cytologische kenmerken te zien in fig. 25, pag. 48.

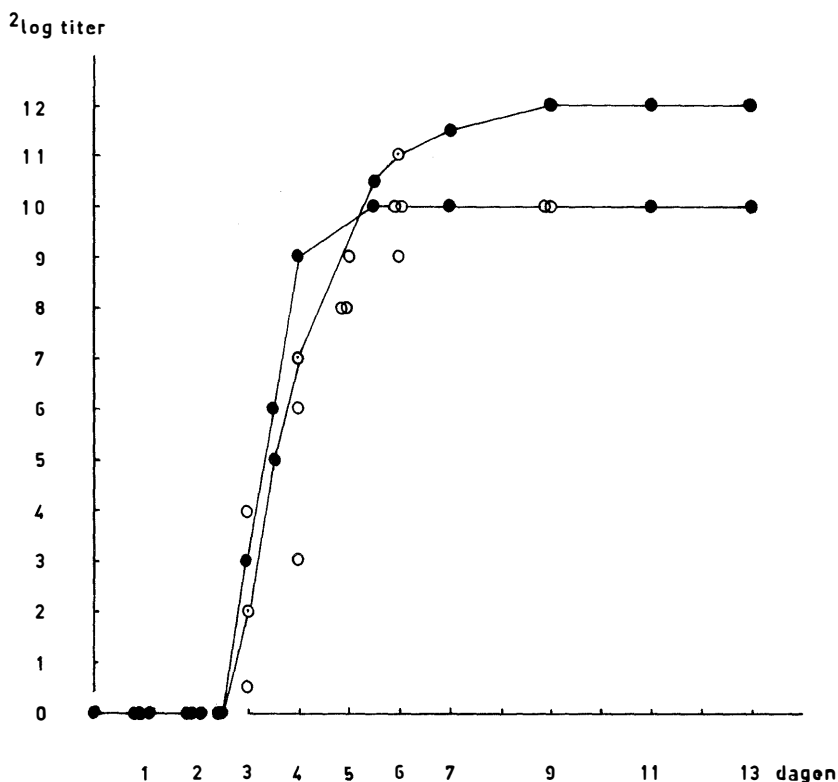


Fig. 15. „Primary response”, paratyphus vaccin.
Verloop van de antilichaamtiter in bloedserum.

antilichaamtiter nagegaan (titercontrole dieren). Van de overige 20 konijnen werden 1, 2, 3, 4, 5, 6 en 9 \times 24 uur na de antigeeninjecties telkens 2, 3 of 4 dieren gedood en de linker popliteale lymphklier, de milt en het beenmerg weggenomen ter bepaling van de antilichaamproductie in weefselkweek. De *rechter* popliteale lymphklier werd gebruikt voor vergelijkend microscopisch onderzoek. Bovendien werd vlak vóór de anti-geentoediening en vlak voor de dood van elk dier een hartpunctie verricht ter bepaling van de antilichaamtiter in het serum.

Het resultaat van de bepalingen van de *antilichaamtiter* is weergegeven in fig. 15. De getrokken lijnen stellen het verloop van de antilichaamtiter

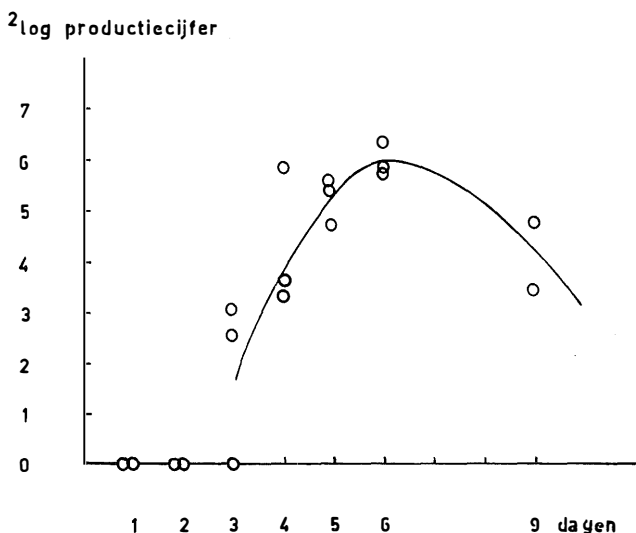


Fig. 16. „Primary response”, paratyphus vaccin. Verloop van de antilichaamproductie in weefselcultuur van de lymphklier. Data ontleend aan de tabel op pag. 103.

voor, zoals dit in de beide titercontrole-dieren werd gevonden. De open cirkeltjes stellen de titerwaarden voor bij de overige dieren op het moment, dat ze werden opgeofferd. Bij geen enkel dier werd een serumtiter gevonden vóór de antigeentoediening met uitzondering van konijn nr. 8 (zie verderop). Het verloop van de titerwaarden komt duidelijk overeen met die uit de vorige proef (fig. 6, pag. 24). Alleen op de vierde dag bleef één titer door onbekende oorzaak achter ten opzichte van de overige titerwaarden. De microscopische beelden kwamen geheel overeen met die van de vorige proef.

De resultaten van de bepalingen der *antilichaamproductie* zijn weergegeven in de tabel op pag. 103. De productiecijfers van de lymphklieren zijn bovendien in fig. 16 grafisch uitgezet. Het blijkt, dat in de lymphklieren vanaf de derde dag een productie kon worden waargenomen. Op de 5e en 6e dag werd de sterkste productie gevonden. Op de 9e dag was de productie al weer minder. In de milt kon pas vanaf de vierde dag een productie worden aangetoond, welke bovendien in het gehele verloop van de reactie zeer gering bleek te zijn. Slechts tweemaal werd een

antilichaamproductie gevonden in de beenmerg-culturen. Beide dieren hadden ook een hoge antilichaamproductie in de weefselculturen van de milt. Bij één dier (konijn nr. 9) werd ook in de lymfklier een abnormaal hoge productie gevonden in vergelijking met de andere dieren op hetzelfde moment. Het andere dier (konijn nr. 8) bleek op de 0e dag reeds een serumtiter te hebben van 1 : 16.

Samenvatting en discussie.

De *plasmacellulaire reactie* in de lymfklier na een subcutane injectie van paratyphus B (H) vaccin begint met de ontwikkeling van „transitional cells” (FAGRAEUS) en plasmablasten. Dit proces is gelocaliseerd in de kleine en grote lymphocytenvelden aan de bases van de follikels. Er worden geen mitosen bij gevonden, zodat het ontstaan van deze cellen waarschijnlijk op een celtransformatie berust. Gedurende de volgende drie dagen ontstaan, nu verspreid door de kleine en grote lymphocytenvelden, nog steeds nieuwe plasmablasten. Tegelijkertijd heeft een ontwikkeling van eerder ontstane plasmablasten plaats, eerst tot onrijpe en daarna tot rijpe plasmacellen; deze tweede fase, de differentiatie-fase van de plasmacellulaire reactie, gaat gepaard met een sterke mitotische vermeerdering van de onrijpe plasmocytaire elementen.

Tijdens dit proces schijnt de localisatie van de plasmacellulaire reactie zich te verplaatsen van de lymphocytenvelden naar de mergstrengen. De histologische waarnemingen tonen echter duidelijk aan, dat het hier niet gaat om een „verplaatsing”, maar dat de lymphocytenvelden, waarin de plasmacellulaire reactie zich afspeelt, „openbreken” en daardoor worden omgevormd in een merggebied met mergstrengen — rondom de arteriolen en venulen — en daartussen gelegen mergsinussen. Een deel van de onrijpe plasmacellen komt hierbij, tesamen met een aantal lymphocyten en „gemobiliseerde” reticulumcellen (macrophagen), vrij in deze sinussen te liggen en wordt klaarblijkelijk met de lymfe afgevoerd. Dit proces heeft ook tot gevolg, dat het aantal rijpe plasmacellen, dat tenslotte in de mergstrengen van de lymfklier achterblijft, slechts een klein deel is van de in totaal tot ontwikkeling gekomen plasmocytaire elementen. Een vermoedelijke consequentie is vooral, dat de met de lymfe versleepte onrijpe plasmacellen elders met hun antilichaamvorming nog enige tijd zullen voortgaan, d.w.z. dat de stijging van de in het bloed circulerende

antilichamen tussen de 4e en 6e dag voor een deel op rekening komt van deze cellen.

Aanwijzingen voor het bestaan van een lymphocytopoietische activiteit in de lymphocytenvelden werden niet gevonden, hoewel het aantal lymphocyten in de velden tijdens de gehele reactie wel verhoogd lijkt.

De *follikelreactie* begint op de derde dag met het verschijnen van een aantal pyroninophile blast-type cellen in de centra. Op de vierde dag is het aantal van deze cellen zo toegenomen, dat de centra er geheel mee zijn bezet. Weer 24 uur later, op de 5e dag na antigeentoediening blijken er van deze blasten nog slechts enkele te zijn overgebleven. Daarvoor in de plaats is een groot aantal „medium-sized” lymphocyten gekomen met er tussenin de phagocyterende reticulumcellen met hun „tingibele Körper” (FLEMMING; 1885). Klaarblijkelijk hebben de eerst aanwezige blast-type cellen zich grotendeels tot „medium-sized” lymphocyten ontwikkeld. Beide celtypen, maar vooral de laatsten, vertonen talrijke mitosen. Het is duidelijk dat deze reactie, wat ook zijn betekenis mag zijn, naast de feitelijke plasmacellulaire reactie, een gevolg is van de antigeentoediening (vgl. LANGEVOORT; 1961). Hoewel een verdere ontwikkeling van deze cellen niet is waargenomen, ligt de veronderstelling voor de hand, dat het bij deze follikelcentrumreactie gaat om lymphocytenvorming.

De gevonden *antilichaamvorming* door de lymphklier in de weefselkweekproeven is geheel in overeenstemming met het waargenomen verloop van de antilichaamtiteren in het bloedserum van de proefdieren. Aan toonbare antilichaamvorming werd het eerst gevonden in lymphklieren, welke drie dagen na de antigeentoediening werden geëxplanteerd: op de derde dag werden voor het eerst ook circulerende antilichamen gevonden. De sterkste antilichaamvorming werd waargenomen in de lymphklieren van de 5e en 6e dag: ook dit correspondeert met de gevonden waarden van de serumtiteren. De waarneming van circulerende antilichamen en van antilichaamproductie in vitro op de derde dag bevestigt de conclusie van FAGRAEUS en anderen, dat de onrijpe plasmacellen de eerste antilichaamvormende en —secernerende cellen zijn. De sterke antilichaamproductie, gevonden op de 5e en 6e dag is evenwel niet te rijmen met de opvatting, dat de onrijpe plasmacellen de grootste hoeveelheid antilichamen zouden produceren. Op de 5e en 6e dag is immers het aantal onrijpe plasmacellen in de lymphklier reeds duidelijk afgenomen. De

conclusie lijkt gerechtvaardigd dat ook de rijpe plasmacellen nog een aanzienlijke bijdrage tot de antilichaamvorming leveren. De activiteit van deze cellen zou dan verantwoordelijk zijn voor de laatste stijging van de antilichaamtiter in het bloedplasma en mogelijk voor het gewoonlijk waargenomen op-niveau-blijven van deze titer gedurende een aantal dagen daarna.

De mogelijkheid, dat de follikels, waarin juist omstreeks de 5e en 6e dag de centrumreactie op gang is gekomen, verantwoordelijk zijn voor de sterke antilichaamvorming op deze dagen, wordt zeer onwaarschijnlijk door de resultaten van de bestralingsproeven, welke aan het eind van dit hoofdstuk zullen worden beschreven.

Het is zonder meer duidelijk, dat onder de omstandigheden van deze proeven, d.w.z. na een eenmalige subcutane antigeentoediening, het aandeel van de regionale lymphklieren in de antilichaamvorming beduidend groter is dan dat van milt en beenmerg.

Welke de betekenis is van de onrijpe plasmacellen, die de lymphklier in grote getale verlaten vanaf de 3e dag, is moeilijk uit te maken. Deze cellen zullen via de lymphhebaan, of in verder stroomafwaarts gelegen lymphklieren of in de bloedbaan terecht komen. Het is aan te nemen dat deze cellen zich dus elders zullen ontwikkelen tot rijpe plasmacellen en een niet onaanzienlijke bijdrage zullen leveren tot de antilichaamvorming. Het is niet waarschijnlijk, dat de in de milt gevonden antilichaamproductie op rekening van deze cellen komt, daar in de milt zelf een — zij het geringe — ontwikkeling van plasmacellen wordt waargenomen onder de omstandigheden van deze proeven. Wel is het mogelijk, dat de antilichaamvorming in het beenmerg, die overigens slechts in twee gevallen een aantoonbare waarde had, berust op het „aanspoelen” van uit de lymphklier afkomstige onrijpe plasmacellen.

DE „PRIMARY RESPONSE” VAN DE LYMPHKLIER OP PAARDEN GAMMA-GLOBULINE

De opzet van deze proef is identiek aan die van de vorige, betreffende de histologische veranderingen in de lymphklier na eenmalige subcutane toediening van paratyphus vaccin. 21 Konijnen kregen een subcutane injectie van paarden gamma-globuline, 5 mg. opgelost in 0,5 ml NaCl 0,9%, in de linker achterpoot. 2 Dieren dienden als titercontroles; van

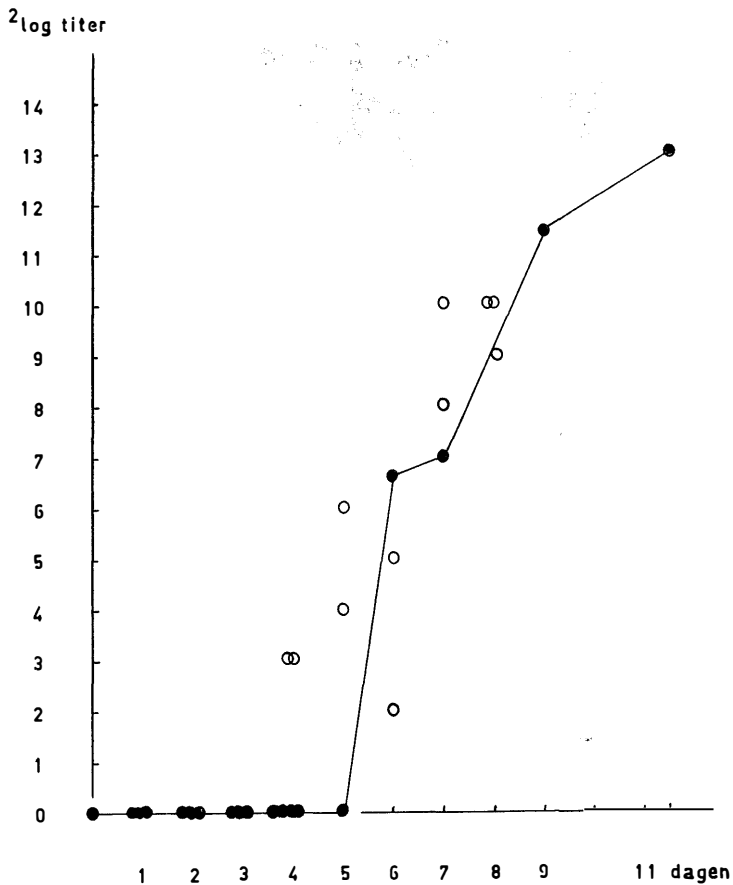


Fig. 17. „Primary response”, Paarden gamma-globuline (PGG)
Verloop van de haemagglutinatietiter in het bloedsérum.

de overige 19 werd na 1 t/m 6 dagen, dagelijks bij 2 of meer dieren, de linker popliteale lymphklier weggenomen voor histologisch onderzoek en tevens werd op dit moment bloed afgenomen voor antilichaamtiteratie. Ook bij deze dieren was weer vóór de antigeeninfectie de rechter popliteale lymphklier weggenomen als histologische controle en bloed afgenomen voor titercontrole.

De microscopische beelden van deze controle-lymphklieren waren alle normaal en kwamen overeen met de eerder gegeven beschrijving.

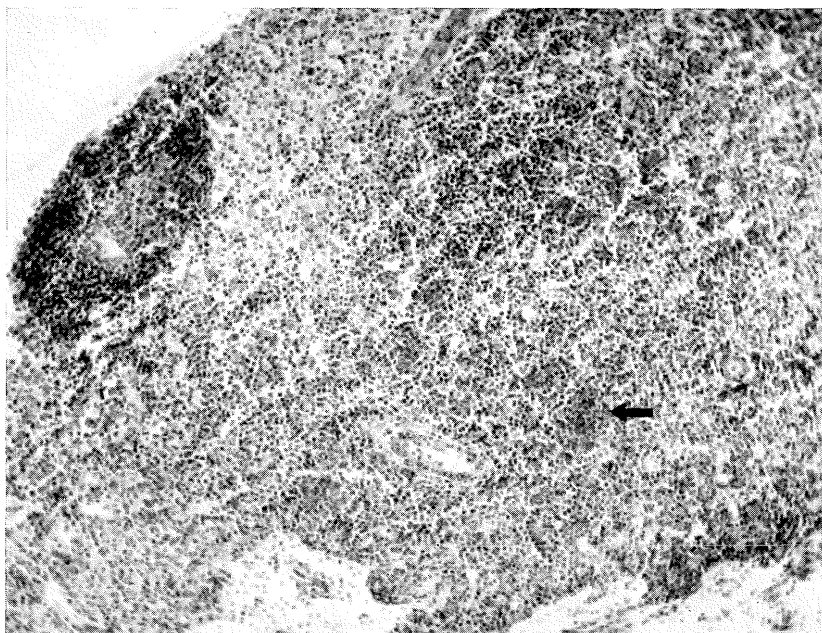


Fig. 18. „Primary response”, PGG; 2×24 uur na antigeen. Overzicht lymfocytenveld waarin enige groepjes plasmablasten; detail, zie fig. 19. Vergr.: $130 \times$.

Het resultaat van de bepalingen van de *antilichaamtiter*s is weergegeven in fig. 17. De getrokken lijn toont het verloop van de antilichaamtiter in één titercontrole-dier. De antilichaamtiter van het tweede dier kon slechts tot op de 6e dag worden bepaald; de titer van dit dier op de 5e dag ontbreekt. De open cirkeltjes geven de waarde van de antilichaamtiter aan van de overige dieren op het moment, dat de linker lymphklier werd weggenomen voor histologisch onderzoek. Het blijkt duidelijk, dat de waarden een grote spreiding vertonen. Dit is mogelijk te wijten aan onervarenheid bij het aflezen van haemagglutinatietiters. De betekenis van deze curve is hierdoor beperkt. Wel is het echter duidelijk, dat de stijging van de antilichaamtiter hier later optreedt dan bij de „primary response” op paratyphus vaccin.

In het *microscopische beeld* vertoonden de lymphklieren, die 24 uur na

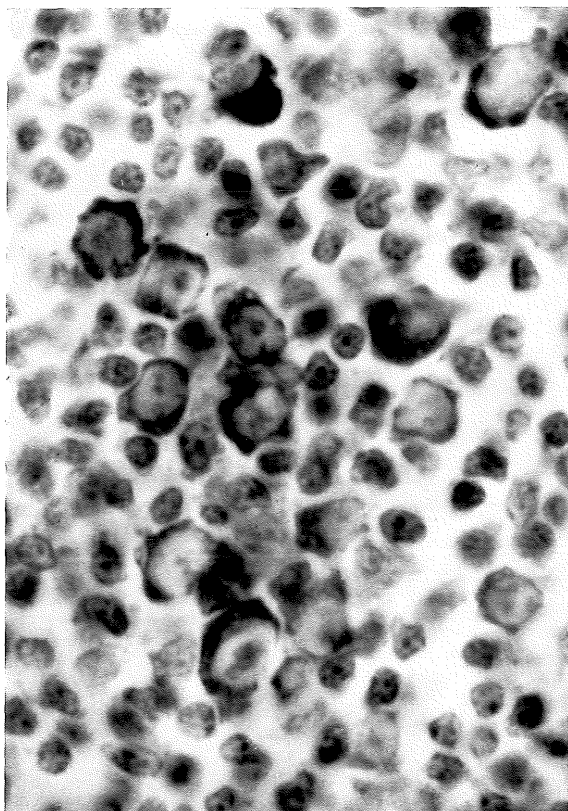


Fig. 19. Sterkere vergroting van het in fig. 18 aangegeven groepje plasmablasten in lymphocytenveld. 1400 \times .

antigeentoeediening werden weggenomen, weinig verschil met de normale controles, behalve dat het aantal kleine lymphocyten wat groter leek.

Na 2×24 uur werden de eerste „transitional cells” en plasmablasten aangetroffen en wel in groepjes midden in de lymphocytenvelden. In fig. 18 is een lymphocytenveld afgebeeld met daarin aangegeven één van de plaatsen waar deze cellen liggen. Uit de sterkere vergroting van dit gebied (fig. 19) blijkt, dat deze cellen cytologisch geheel overeenkomen met de cellen, welke werden gevonden op de eerste dag van de „primary response” na paratyphus vaccin (vgl. fig. 7, pag. 25). Alleen de localisatie

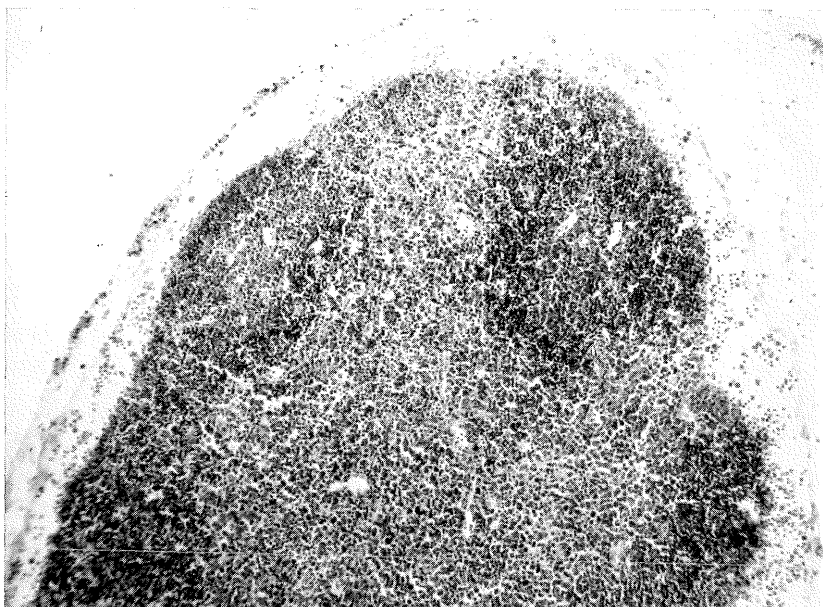


Fig. 20. „Primary response”, PGG; 4×24 uur na antigeen. Overzicht lymphocytenveld vol met jonge plasmacellen en plasmablasten; detail, zie fig. 21. Vergr.: $100 \times$.

is hier duidelijk anders: van een voorkeursligging aan de bases der follikels is hier geen sprake. Behalve, dat het aantal kleine lymphocyten ook bij deze lymphklieren groter leek dan bij de controles, werden verder geen veranderingen waargenomen. De follikels vertoonden de normale indifferente centra.

3×24 Uur na de antigeentoediening was het aantal plasmablasten in de lymphocytenvelden toegenomen, terwijl reeds een verdere differentiatie tot onrijpe plasmacellen plaats vond. Beide celtypen lagen verspreid door de lymphocytenvelden en in gering aantal ook in de mergstrengen, grenzend aan de lymphocytenvelden. Op meerdere plaatsen waren „openbrekende” lymphocytenvelden aanwezig, terwijl in de mergsinussen een aantal jonge plasmocyttaire elementen werden aangetroffen. Voor het overige was het grotere aantal kleine lymphocyten het enige verschil met de controles.

4×24 Uur na de antigeentoediening was het aantal plasmablasten en

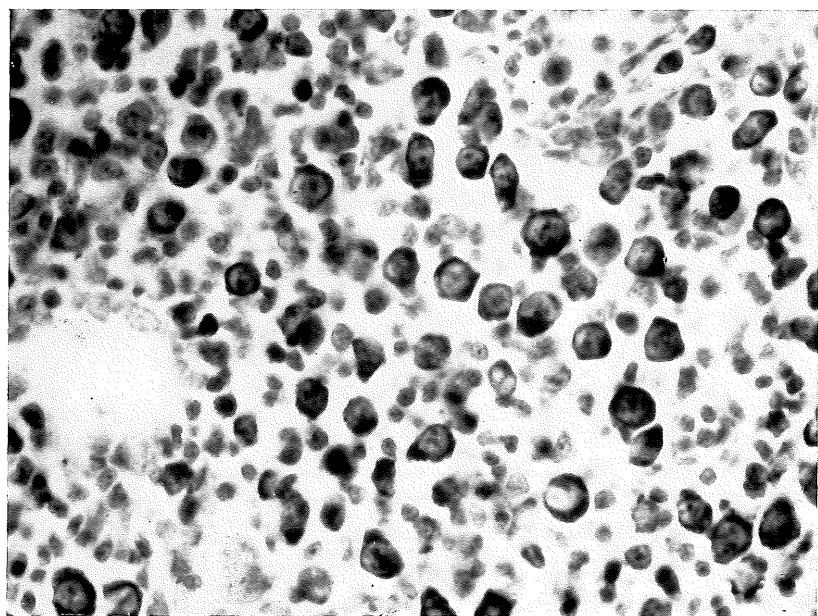


Fig. 21. Sterkere vergroting uit fig. 20, van het middengebied. Plasmablasten en onrijpe plasmacellen in lymphocytenveld. Vergr.: 650 \times .

onrijpe plasmacellen enorm toegenomen. Dit wordt geïllustreerd met fig. 20, waarvan een deel in fig. 21 sterker vergroot is weergegeven. Niet alleen in de lymphocytenvelden, maar ook in de mergstrengen en vrij in de mergsinussen werden jonge plasmacellen aangetroffen. Ook hier houdt dit weer verband met het „openbreken” van de lymphocytenvelden, waardoor uit lymphocytenvelden nieuwe merggebieden met mergstrengen en mergsinussen ontstaan. In fig. 22, waarvan het „openbrekende” gebied sterker vergroot in fig. 23 is afgebeeld, ziet men, dat de overgang tussen merg en schors hier niet scherp is afgegrensd. Rondom een arteriole blijven nog wat lymphocyten en plasmacellen liggen, terwijl rechts daarvan de cellen lijken te verdwijnen, zodat daar tenslotte een mergsinus zal ontstaan. In de follikels werden op deze dag de eerste veranderingen gezien. De centra waren volledig gevuld met pyroninophile blast-type cellen. Het beeld van deze follikels was geheel identiek aan dat van de follikels vier dagen na paratyphus vaccin (vergelijk fig. 13, pag. 31). De follikelcentra waren van de lymphocytenvelden met hun vele plasma-

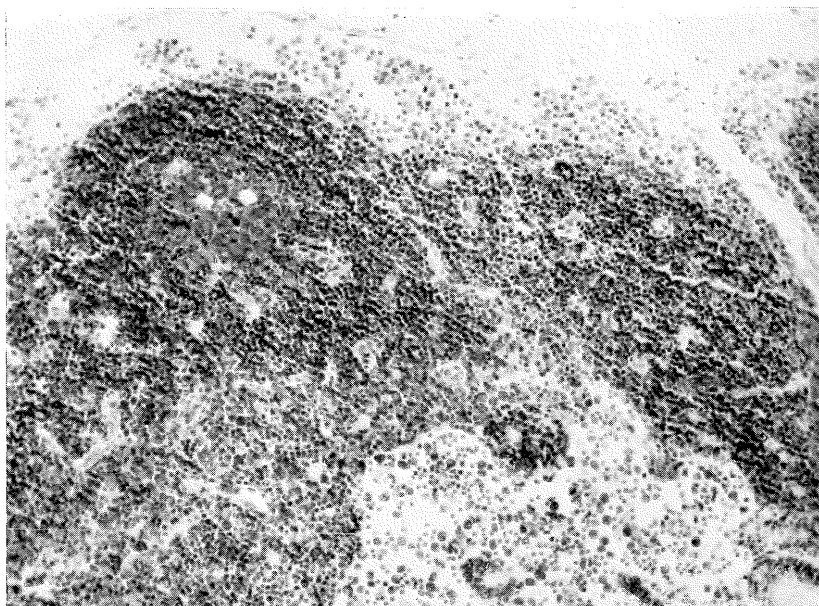


Fig. 22. „Primary response”, PGG; 4 × 24 uur na antigeen. Overzicht van grensgebied lymphocytenveld met mergsinus; follikelcentrum gevuld met blast-type cellen; plasmablasten en onrijpe plasmacellen in lymphocytenveld en mergsinus; detail, zie fig. 23. Vergr.: 170 ×.

blasten slechts gescheiden door de lymphocytenkrans, welke vrij breed was en dicht met lymphocyten bezet. In de lymphocytenvelden viel overigens ook het grote aantal lymphocyten op.

5 Dagen na de antigeentoeediening was het aantal plasmablasten sterk afgenomen; het aantal onrijpe en rijpe plasmacellen lijkt daarentegen duidelijk toegenomen. Deze cellen zijn gelocaliseerd aan de rand van de lymphocytenvelden en in de aangrenzende mergstrengen, terwijl de centrale delen van de lymphocytenvelden weer voornamelijk door kleine lymphocyten zijn bezet. Het totale aantal lymphocyten was nog groot, als op de vierde dag na antigeen. „Openbrekende” lymphocytenvelden werden op meerdere plaatsen waargenomen; in de mergsinussen werden vele jonge plasmacellen aangetroffen temidden van talrijke, eveneens vrijliggende, kleine lymphocyten.

In de follikelcentra was het aantal blast-type cellen weer afgenomen ten

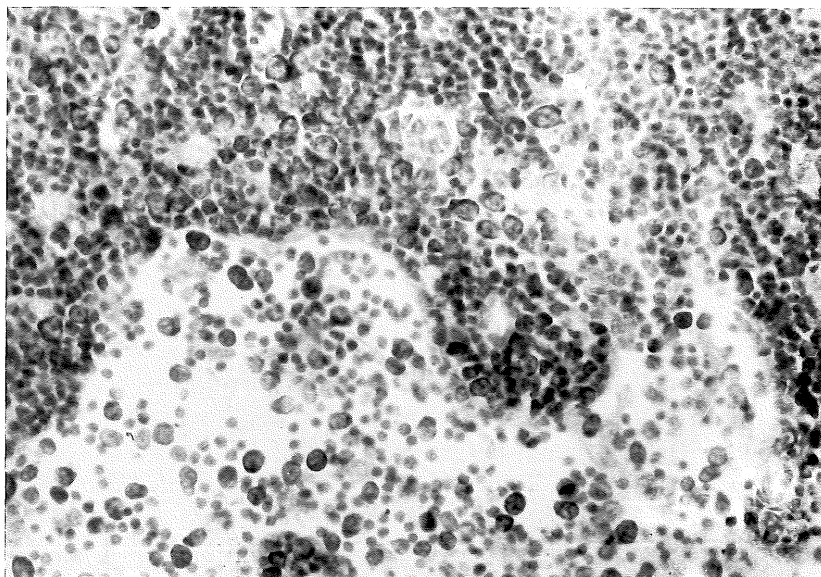


Fig. 23. Sterkere vergroting uit fig. 22, van het middengebied. „Openbrekend” lymphocytenveld (rechts); jonge plasmocyttaire elementen in lymphocytenveld en mergsinus. Vergr.: 360 \times .

opzichte van het aantal „medium-sized” lymphocyten. Tussen deze laatste lagen weer phagocyterende reticulumcellen met phagocytose-insluitsels („tingibele Körper”) van gedegenererde cellen.

Na 6 dagen was een verdere regressie van de plasmacellulaire reactie waar te nemen. Het aantal plasmablasten was tot een gering aantal gereduceerd: nog slechts enkele onrijpe plasmacellen werden in de mergstrengen en aangrenzende lymphocytenvelden aangetroffen. Het aantal rijpe plasmacellen daarentegen was groot en mogelijk nog toegenomen ten opzichte van het aantal op de 5e dag; ze waren voornamelijk gelocaliseerd in de mergstrengen. Op meerdere plaatsen werden „openbrekende” lymphocytenvelden aangetroffen en vrij in de mergsinussen lagen nog verschillende jonge plasmocyttaire elementen. Het totaal aantal lymphocyten lijkt groter dan normaal, echter in vergelijking met het beeld van de 5e dag afgenomen. De follikels vertoonden, zij het iets minder karakteristiek dan is afgebeeld in fig. 14, (pag. 32), uit de paratyphus-serie, het „sterrenhemel” beeld: „medium-sized” lymphocyten vormden de meer-

derheid van de aanwezige cellen, daartussen lagen verspreid phagocyterende reticulomcellen met „tingibele Körper”.

Samenvatting en discussie.

In grote lijnen verloopt de plasmacellulaire reactie tijdens de „primary response” in de popliteale lymfeklier na een subcutane injectie van paarden gamma-globuline identiek aan die na paratyphus vaccin. Ook hier ontstaan de eerste plasmocyttaire elementen, „transitional cells” en plasmablasten, in de lymphocytenvelden van de schors. Ook hier valt de sterke toename op van het aantal jonge plasmacellen tijdens het differentiatieproces tot onrijpe en rijpe plasmacellen gedurende de volgende dagen. Ook hier, tenslotte, is er een schijnbare „verplaatsing” van de plasmacellulaire reactie naar de merggebieden, in werkelijkheid een gevolg van het „openbreken” der lymphocytenvelden. Uit deze lymphocytenvelden ontstaan op deze wijze mergstrengen (rondom arteriolen en venulen) en mergsinussen, waarbij tegelijkertijd grote aantallen jonge plasmacellen vrij in de sinussen komen te liggen. Ook de follikelcentrumreactie verloopt op dezelfde wijze als na paratyphus vaccin.

Op een drietal punten echter zijn duidelijke verschillen aan te wijzen tussen de reactie na PGG en die na paratyphus vaccin. In de eerste plaats is het begin van de plasmacellulaire reactie na PGG ongeveer één dag vertraagd ten opzichte van de paratyphus-serie ¹. Opgemerkt moet worden dat een dergelijk verschil door LANGEVOORT (1961) niet werd gevonden bij de plasmacellulaire reacties in de milt, na intraveneuze toediening van dezelfde antigenen. In de tweede plaats is er een opvallend verschil in de localisatie van de eerst-verschijnende plasmocyttaire elementen. In tegenstelling tot de paratyphus-serie werd na PGG géén voorkeurslocalisatie van deze eerst-ontstane „transitional cells” en plasmablasten aan de bases van de follikels waargenomen, maar lagen deze cellen in groepjes duidelijk verspreid door de lymphocytenvelden. Op de mogelijke betekenis hiervan zal na de bespreking van de „secondary responses” nog nader worden ingegaan.

Een belangrijk verschil, tenslotte, met de paratyphus-serie is het schijnbaar ontbreken van een goede correlatie tussen de histologische veranderingen in de lymfklier en het verloop van de serumtiter na PGG. Hoe-

¹ Dit geldt overigens niet voor de follikelcentrumreactie.

wel de haemagglutinatietitraties van de antilichamen tegen PGG waarschijnlijk niet een optimale betrouwbaarheid hebben gehad, is het toch duidelijk, dat het eerste verschijnen van de titer méér vertraagd is dan de histologisch waargenomen plasmacellulaire reactie. De oorzaak van deze discrepantie ligt waarschijnlijk in het feit, dat het PGG is gebruikt in een dosering, die aanzienlijke hoeveelheden antilichaam kan binden. In niet-gepubliceerde waarnemingen van LANGEVOORT bleek een tweede (I.V.) PGG toediening, 21 dagen na een eerste (I.V.) injectie, regelmatig binnen 24 uur een daling van de serumtiter van $\pm 1 : 8000$ tot $\pm 1 : 2000$ te veroorzaken (uiteraard daarna gevolgd door een sterke „secondary response”-stijging). In verband hiermee lijkt de conclusie gewettigd, dat in onze proeven de eerst gevormde antilichamen onmiddellijk door het nog circulerende antigeen worden gebonden en dat een titer pas verschijnt nadat dit antigeen volledig is gebonden en/of geëlimineerd. Deze veronderstelling is slechts te toetsen door het beginmoment te bepalen van de zg. immuun-eliminatie van het ingespoten antigeen. Dat een antigeen als het paratyphusvaccin in deze opzichten geen moeilijkheden geeft, en dus gunstiger experimentele omstandigheden schept, hangt uiteraard daarmee samen dat slechts minimale hoeveelheden H-antigeen voldoende zijn om een sterke plasmacellulaire reactie en antilichaamvorming op te wekken.

Het lijkt waarschijnlijk, dat bij het veelvuldige gebruik van serum-eiwitten als antigenen in immunologische experimenten met deze omstandigheid als regel onvoldoende rekening wordt gehouden.

Tenslotte kan nog worden opgemerkt dat, evenals bij de paratyphusproeven, ook in de lymphklieren na PGG geen tekenen van lymphocytopoiese werden waargenomen anders dan de mogelijk als zodanig te interpreteren follikelcentrumreacties.

DE „SECONDARY RESPONSE” VAN DE LYMPHKLIER OP PARATYPHUS-B(H) VACCIN

In deze proefserie werden het verloop van de antilichaamtiter in het bloed en de microscopische veranderingen in de regionale lymphklier nagegaan na een *tweede* subcutane toediening van paratyphus-B(H) vaccin.



Fig. 24. „Primary response”, paratyphus vaccin; 28 dagen(!) na antigeen. Follikel met nog actieve centrumreactie; detail, zie fig. 25. Vergr.: 250 ×.

Bij 14 konijnen werd, als eerste antigeentoediening, zowel in de linker als in de rechter achterpoot subcutaan 0,2 ml. paratyphus vaccin ingespoten. Acht en twintig dagen later werd opnieuw eenzelfde antigeeninjectie gegeven maar nu alleen in de linkerpoot.

Bij 2 van deze dieren, de titercontroles, werd de antilichaamtiter in het bloed bepaald en wel vlak vóór de eerste en de tweede antigeeninjectie en verder dagelijks gedurende tien dagen na de tweede antigeeninjectie.

Bij de overige dieren werd 1, 2, 3, 4, 5, en 6 × 24 uur na de tweede

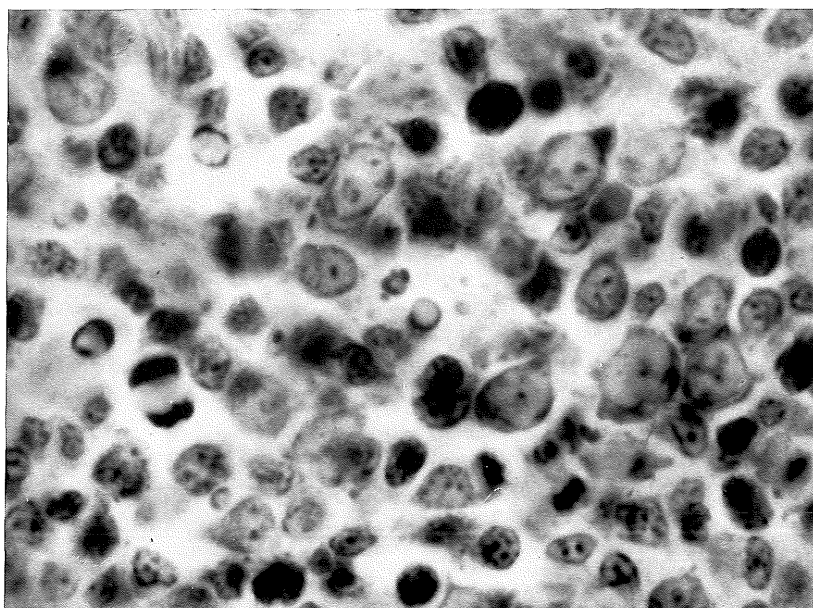


Fig. 25. Sterkere vergroting van het follikelcentrum uit fig. 24. Blast-type cellen, „medium-sized” lymphocyten, mitosen en „tingible Körper (niet duidelijk) in phagocyterende reticulumcellen. Vergr.: 1500 \times .

antigeeninjectie telkens bij twee konijnen de linker popliteale lymphklier weggenomen. De antilichaamtiter in het bloed werd bij deze dieren bepaald vlak vóór de eerste en de tweede antigeen-injectie en verder op het moment dat de linker popliteale lymphklier voor histologisch onderzoek werd weggenomen. Als controle op histologische veranderingen, welke mogelijk nog resteerden van de eerste antigeen-injectie, werd bij deze dieren de rechter popliteale lymphklier weggenomen vlak vóór de tweede antigeentoediening.

Bij alle dieren steeg de *antilichaamtiter* na de eerste antigeeninjectie van 0 tot waarden tussen 10 en 13 ($= {}^2\log$. titer).

Na de tweede antigeeninjectie werd merkwaardigerwijze slechts een geringe stijging van de antilichaamtiter gevonden. In de gunstigste gevallen werd een stijging van de ${}^2\log$ titer met 1 waargenomen, d.w.z. een verdubbeling van de hoeveelheid circulerende antilichamen; bij vier van

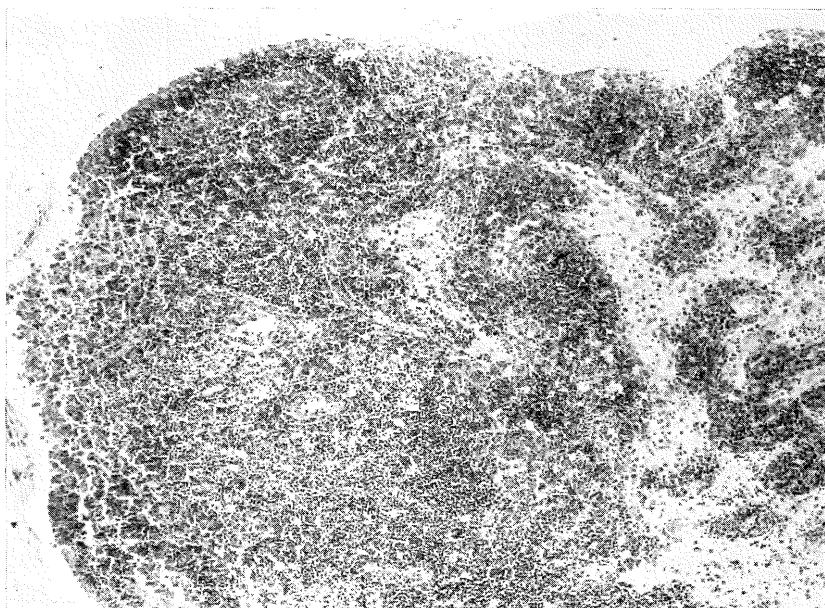


Fig. 26. „Secondary response”, paratyphus vaccin; 2 × 24 uur na antigeen. Overzicht „openbrekend” lymphocytenveld; detail, zie fig. 27. Vergr.: 100 ×.

de twaalf dieren was ook deze geringe stijging na de 4de dag nog niet aantoonbaar.

De *microscopische beelden* van de als controle weggenomen rechter popliteale lymphklieren vertegenwoordigen de uitgangstoestand vlak vóór de tweede antigeeninjectie, m.a.w. de toestand 28 dagen na de eerste vaccintoediening. Deze lymphklieren bleken een vrij „normale” hoeveelheid rijpe plasmacellen te bevatten; van een verhoging van het aantal rijpe plasmacellen als gevolg van de doorgemaakte „primary response” was geen sprake.

De follikels waren echter nog niet weer tot de normale, indifferente toestand teruggekeerd zoals in fig. 24 bij zwakke vergroting al duidelijk waarneembaar is. Vooral fig. 25 echter, een sterkere vergroting van dezelfde follikel, toont duidelijk dat in het follikelcentrum nog steeds de „medium-sized” lymphocyten overheersen, terwijl daarnaast enkele grotere blast-type cellen („large lymphocytes”, lymphoblasten?) voor-

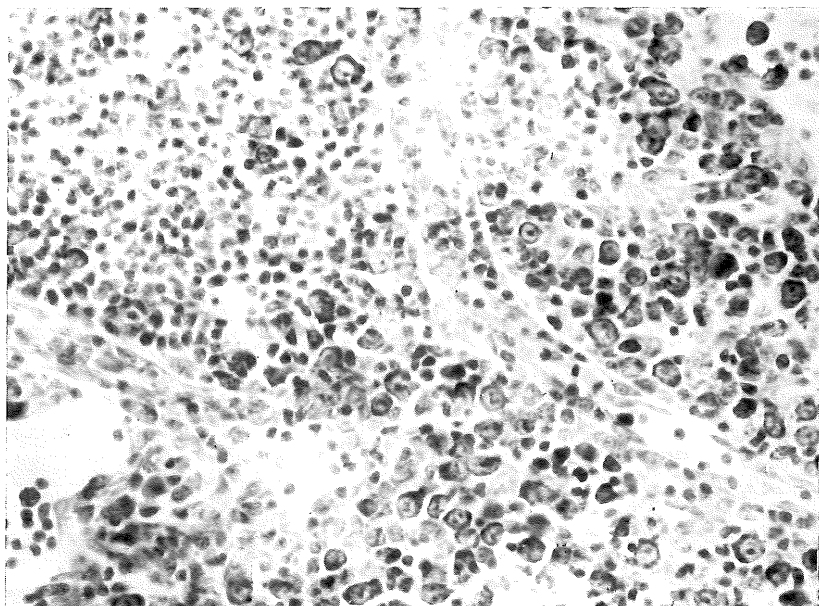


Fig. 27. Sterkere vergroting uit fig. 26, van het middengebied links. „Epitheloide” venule, omgeven door veel jonge plasmacelvormen; linksonder nieuw gevormde mergsinus. Vergr.: 460 \times .

komen; in de figuur zijn meerdere mitosen te zien en voorts de bekende tekenen van celverval in de vorm van „tingibele Körper”, opgenomen in phagocyterende reticulumcellen. De follikelcentrumreactie was dus — 28 dagen na de eerste antigeentoediening — nog niet tot rust gekomen. Voor het overige was het beeld van deze lymphklieren normaal.

In de lymphklieren welke 24 uur na de tweede antigeeninjectie waren weggenomen, werd aan de basis van de follikels al direct een vrij groot aantal pyroninophile cellen gevonden, welke ook hier op grond van de morfologie en verdere differentiatie als plasmablasten moeten worden beschouwd. Elders in de lymphklier werden geen veranderingen opgemerkt.

2 \times 24 Uur na de tweede antigeeninjectie was het aantal plasmablasten sterk toegenomen, en was bovendien al een groot aantal onrijpe plasmacellen ontstaan. Deze cellen lagen over het gehele lymphocyten-

veld verspreid, vooral echter aan de randen van deze velden en langs de „epitheloïde” venulen, zoals is te zien in de figuren 26 en 27, waarvan de laatste een sterkere vergroting is van het gebied dat in fig. 26 links, onder de follikel is gelegen. Ook in de mergstrengen en de mergsinus lagen op dit moment al plasmablasten, vooral bij „openbrekende” gebieden zoals eveneens te zien is in de figuren 26 en 27.

Het follikelbeeld kwam overeen met dat in de controle lymphklieren; het was moeilijk uit te maken of van een stimulering van de reeds bestaande follikelreactie kon worden gesproken.

Het totaal aantal lymphocyten lijkt iets groter dan normaal.

24 Uur later, *drie dagen* na de tweede antigeentoediening was het aantal plasmablasten afgenomen terwijl het aantal onrijpe plasmacellen min of meer gelijk was gebleven. Deze cellen lagen weer aan de randen van de lymphocytenvelden vooral aan de mergzijde; ook in de mergstrengen zijn de onrijpe plasmacellen talrijk, terwijl hier het aantal rijpe plasmacellen reeds duidelijk is toegenomen. Ook in deze lymphklieren werd weer het „openbreken” der lymphocytenvelden waargenomen en was het aantal jonge pyroninophile cellen in de mergsinussen zeer groot.

Het follikelbeeld was als dat van de controle dieren; mogelijk was het aantal blast-type cellen iets toegenomen. Het totaal aantal lymphocyten leek ook hier groter dan normaal.

4 *Dagen* na de tweede antigeentoediening was het aantal plasmablasten en onrijpe plasmacellen duidelijk afgenomen; de rijpe plasmacellen waren veel talrijker geworden. Fig. 28 toont de localisatie van deze cellen, aan de rand van een lymphocytenveld en in de mergstrengen. Het lymphocytenveld zelf was weer bijna uitsluitend met lymphocyten bezet. In de mergsinussen kwamen nog vele jonge plasmacellen voor, maar wel minder dan 24 uur tevoren.

In de follikels werden iets mèèr blast-type cellen en phagocyterende reticulumcellen gevonden; de centra waren duidelijk groter geworden.

5 en 6 *Dagen* na de tweede antigeentoediening was de plasmacellulaire reactie bijna geheel tot rust gekomen. Op de 5e dag was nog slechts sprake van enkele plasmablasten en onrijpe plasmacellen; ze waren gelocaliseerd in de randen der lymphocytenvelden en in de mergstrengen. Het aantal rijpe plasmacellen in de mergstrengen was echter aanzienlijk. Op de 6e dag was alleen een groot aantal rijpe plasmacellen over, gelegen in de mergstrengen. Alhoewel nog steeds „openbrekende” gebieden werden

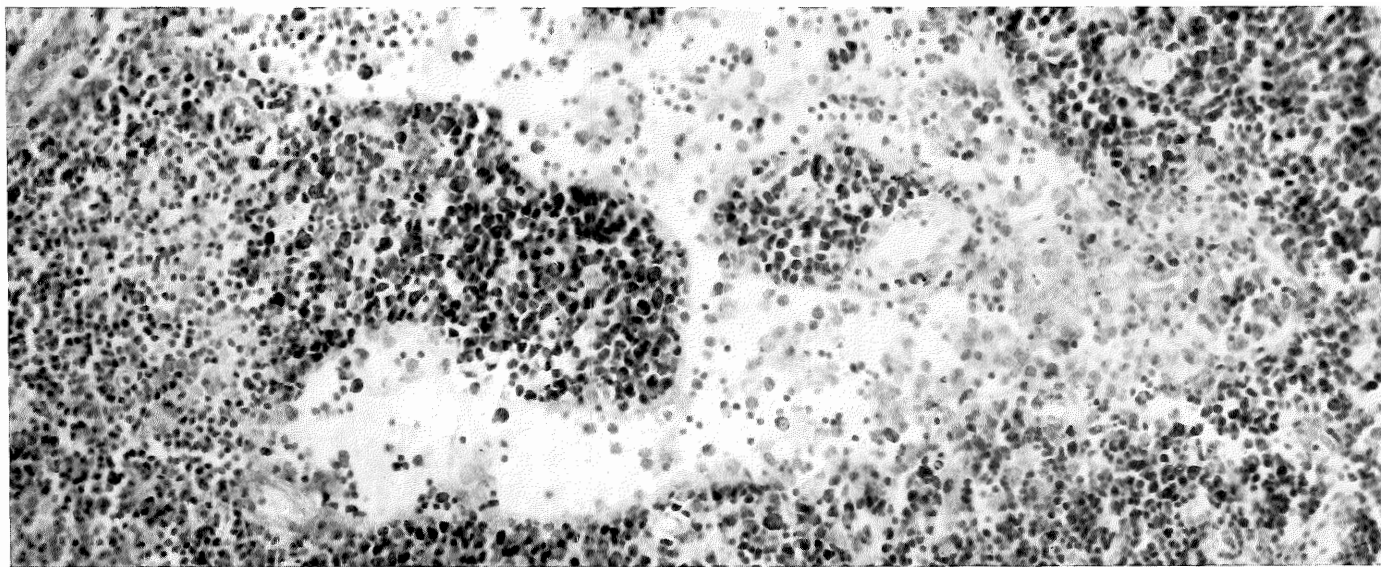


Fig. 28. „Secondary response”, paratyphus vaccin; 4×24 uur na antigeen. „Openbrekend” lymphocytenveld (rechts); plasmocyttaire elementen in mergstrengen en mergsinus; lymphocytenveld (geheel links) vrijwel zonder plasmacellen. Vergr.: $280 \times$.

aangetroffen, was het aantal jonge pyroninophile cellen in de mergsinus gering.

Samenvatting en discussie.

Evenals bij de „primary response” na paratyphus vaccin worden ook bij de „secondary response” de eerste veranderingen gevonden in de lymphocytenvelden van de schors: „transitional cells” en plasmablasten verschijnen aanvankelijk vooral aan de bases der follikels, spoedig daarna verspreiden ze zich door de lymphocytenvelden. Ook nu leidt weer het „openbreken” van deze lymphocytenvelden tot de vorming van mergstrengen, waarin met wat lymphocyten een deel van de plasmacellen achterblijft, en van sinussen welke naast lymphocyten talloze vrij liggende jonge plasmacellen bevatten die met de sinuslymphe worden afgevoerd.

In vergelijking met de „primary response” vallen voornamelijk twee verschillen op: de reactie na de tweede antigeentoediening verloopt duidelijk sneller en het aantal in de mergstrengen achterblijvende rijpe plasmacellen is groter.

Een correlatie van de plasmacellulaire reactie met de stijging van de serumtiter was in dit geval niet mogelijk; de waargenomen titerstijging lijkt verrassend gering in vergelijking met de toch zeer sterke plasmacellulaire reactie. Een verklaring voor deze discrepantie kan niet worden gegeven.

De follikelreactie tijdens de „secondary response” was moeilijk te beoordelen, doordat nog steeds een reactie in de follikelcentra resteerde als gevolg van de „primary response”. Een zekere mate van stimulering van de follikelcentrumreactie leek wel plaats te hebben.

Op verschillende van deze punten zal bij de bespreking van de „secondary response” op PGG nog nader worden ingegaan.

DE „SECONDARY RESPONSE” VAN DE LYMPHKLIER OP PAARDEN GAMMA-GLOBULINE

De opzet van deze proef was identiek aan die van de vorige. 14 Kojinnen kregen als eerste antigeentoediening in *beide* achterpoten een subcutane injectie van 5 mg PGG, opgelost in 0,5 ml NaCl 0,9%. 28 Dagen later volgde de tweede antigeentoediening, 5 mg PGG subcutaan ingespoten in de *linker* achterpoot. 2 dieren dienden weer als titercontroles; van de overige 12 dieren werd 1, 2, 3, 4, 5 resp. 6 \times 24 uur na

$2\log$ titer stijging

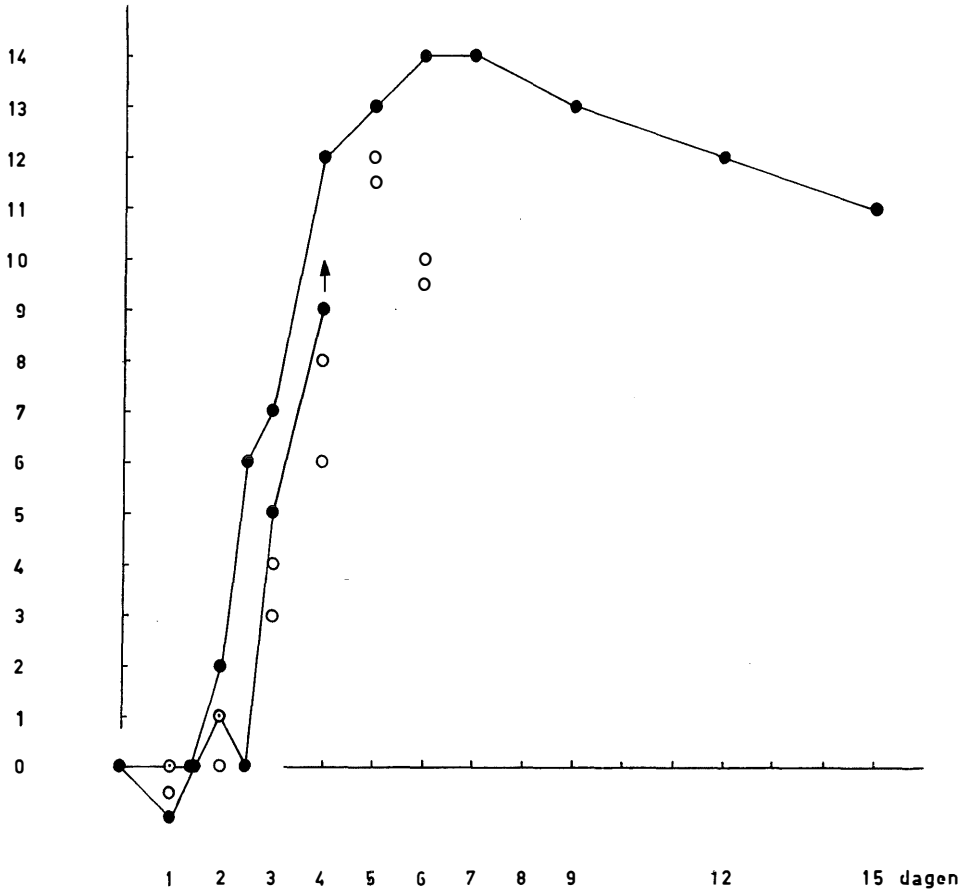


Fig. 29. „Secondary response”, PGG. Verloop van stijging der haemagglutinatietiters na de tweede antigeen injectie.

de tweede antigeentoediening telkens bij twee konijnen de linker popliteale lymphklier weggenomen, en de antilichaamtiter bepaald. Vlak vóór de tweede antigeentoediening werd bij deze dieren de rechter popliteale lymphklier weggenomen voor de microscopische controlebeelden, terwijl tevens bloed werd afgenomen voor de antilichaamtiter-bepaling.

De *haemagglutinatietiters* van alle dieren bereikten in de 28 dagen

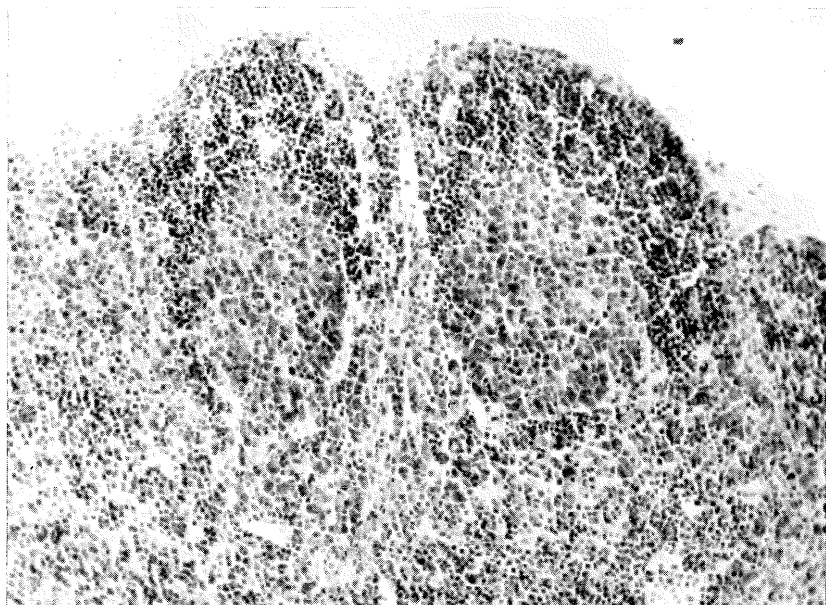


Fig. 30. „Secondary response”, PGG; 24 uur na antigeen. Overzicht van twee follikels aan rand van lymfocytenveld; plasmablasten aan basis van deze follikels niet duidelijk zichtbaar, zie fig. 31. Vergr.: 190 \times .

na de eerste PGG-toediening waarden tussen 9 en 12 (2^{\log} titer). In de curve van de „secondary response” — fig. 29 — zijn deze verschillende waarden als uitgangswaarden alle op 0 gesteld. De curve zelf geeft dus de *stijging* van de haemagglutinatietiters weer, uitgedrukt in 2^{\log} titerstijging boven deze uitgangswaarde. De doorlopende getrokken lijn stelt het verloop van de titerstijging voor van één van de titercontrole dieren. Van het tweede titercontrole dier is de verdunningsreeks vanaf de vierde dag niet ver genoeg uitgezet; het begin van deze curve is eveneens met een getrokken lijn aangegeven. De open cirkeltjes geven de titerstijging weer, welke bij de overige dieren werd gevonden op het moment, dat de linker popliteale lymphklier werd weggenomen. De inductieperiode bleek 2 à 3 \times 24 uur te bedragen; gedurende de inductieperiode werd in enkele gevallen een kortdurende daling van de titer gevonden (vgl. pg. 46). Daarna trad een zeer sterke stijging op, waarbij de titer omstreeks de zesde dag haar hoogtepunt bereikte, gevolgd door een langzame daling.

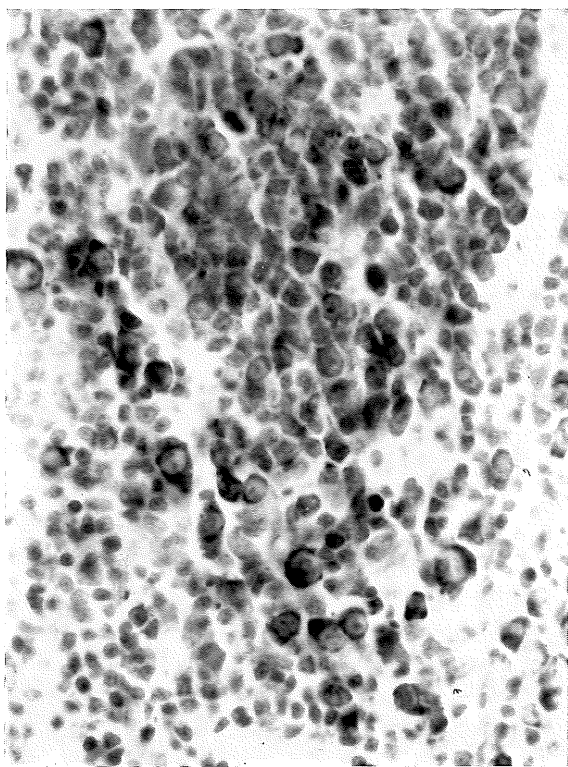


Fig. 31. Sterkere vergroting van de basis van de linker follikel uit fig. 30; plasmablasten aan de basis van de follikel. Vergr.: 540 \times .

De *microscopische beelden* van de rechter popliteale lymphklieren, welke als controles werden weggenomen vlak vóór de tweede antigeen-toediening, vertoonden dezelfde beelden als in de controles bij de „secondary response” op paratyphus B(H) werden gevonden. Behalve een nog duidelijk niet tot rust gekomen follikelcentrumreactie bleken deze lymphklieren het beeld van een normale popliteale lymphklier te vertonen. Met name was van een verhoogd aantal rijpe plasmacellen geen sprake.

In de lymphklieren, welke 24 uur na de tweede PGG-injectie werden weggenomen, was al direct een groot aantal „transitional cells” en plasma-

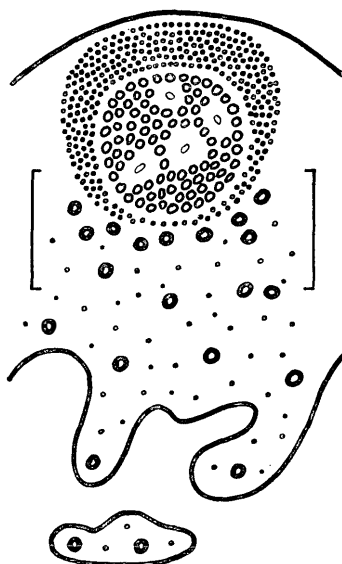


Fig. 32. „Secondary response”, PGG; 24 uur na antigeen. Situatieschets van het in fig. 33 afgebeelde gebied.

blasten te zien. Een deel van deze cellen lag duidelijk bijeen aan de bases der follikels en in de periferie der lymphocytenvelden tussen de follikels; een ander deel werd verspreid in de lymphocytenvelden aangetroffen, terwijl plasmablasten ook al direct in de mergstrengen verschenen. In fig. 30 zijn twee follikels afgebeeld, welke gelegen zijn aan de rand van een lymphocytenveld. De linker follikel hiervan is in fig. 31 sterker vergroot weergegeven. Men ziet hier de „transitional cells” en plasmablasten zich in een zoom langs de basis van de follikel uitstrekken. Ook in fig. 33, waarvan de ligging schematisch is aangegeven in de tekening van fig. 32, ziet men het grote aantal „transitional cells” en plasmablasten aan de basis van de follikel. Deze nieuw ontstane plasmocyttaire elementen zijn van het follikelcentrum duidelijk gescheiden door een, overigens uiterst dunne, lymphocytenkrans. Op de celpopulatie van dit gebied zal later nog worden ingegaan aan de hand van een sterkere vergroting van het rechter deel van fig. 33 cf (fig. 40, pag. 82). In de tekening (fig. 32) is nog aangegeven, dat ook verspreid in het lymphocyten-

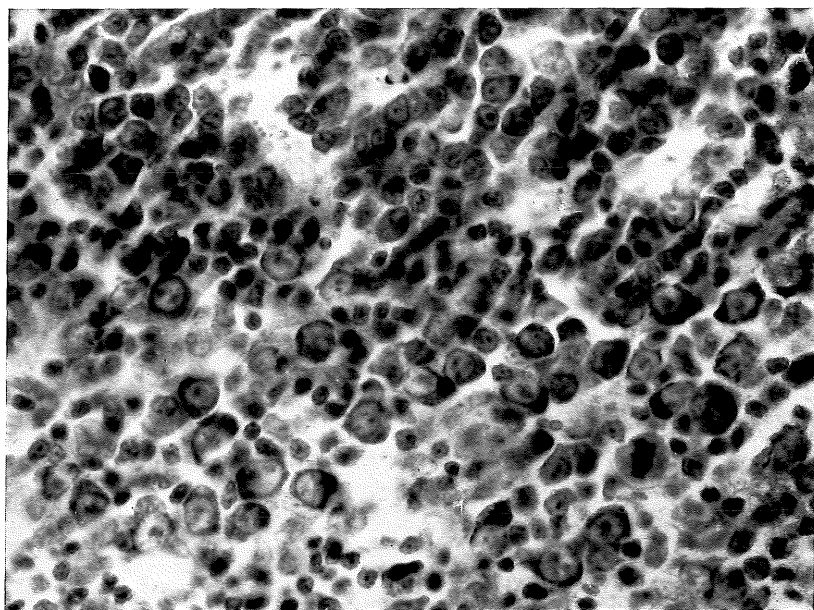


Fig. 33. „Secondary response”, PGG; 24 uur na antigeen. Groot aantal „transitional cells” en plasmablasten in lymphocytenveld aan basis van follikel; in follikelcentrum, geheel boven, „tingible Körper” en „medium-sized” lymphocyten; detail, zie fig. 40 en 41, pag. 82 en 83. Vergr.: 700 \times .

veld en in de op het lymphocytenveld aansluitende mergstrengen reeds een aantal plasmablasten aanwezig was. In de follikelcentra overheersten de „medium-sized” lymphocyten, zoals in het afgebeelde deel van de follikel in fig. 33 duidelijk tot uiting komt. Ook de aanwezigheid van reticulumcellen met „tingibele Körper” is in deze afbeelding te zien.

2 \times 24 Uur na de tweede antigeentoediening was het aantal jonge plasmacellen enorm toegenomen. Overal in de lymphklier, met uitzondering van de follikels, kwamen ze in grote aantallen voor. Fig. 34 toont bij zwakke vergroting een follikel gelegen aan de rand van een lymphocytenveld en het begin van het op dit lymphocytenveld aansluitende merggebied. Zowel in het lymphocytenveld, bij sterkere vergroting afgebeeld in fig. 35, als in de mergstrengen, vergroot weergegeven in fig. 36, komen grote aantallen jonge plasmacellen voor, gedeeltelijk als plasmablasten, gedeeltelijk reeds verder ontwikkeld tot onrijpe plasmacellen.

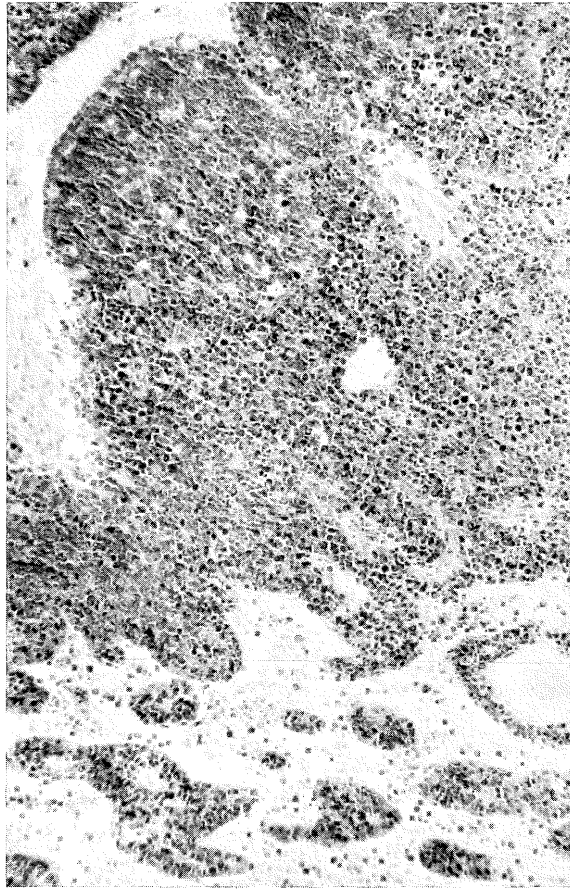


Fig. 34. „Secondary response”, PGG; 2×24 uur na antigeen. Overzicht follikel, lymphocytenveld en merggebied; grote aantallen plasmablasten en onrijpe plasmacellen in lymphocytenveld, mergsinus en mergstrengen; detail zie fig. 35 en 36. Vergr.: $190 \times$.

In deze lymphklieren waren ook weer „openbrekende” lymphocytenvelden te zien, en zoals uit fig. 36 blijkt, werden ook vele jonge pyroninofiele cellen in de mergsinussen aangetroffen.

In het beeld van de follikels was weinig verandering te constateren; in de centra overheersten de „medium-sized” lymphocyten waarvan ver-

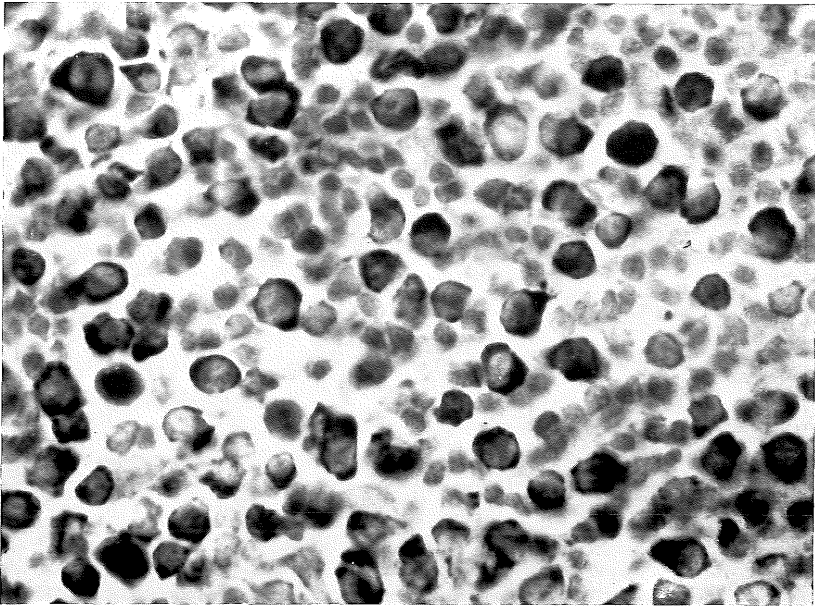


Fig. 35. Sterkere vergroting van het lymphocytenveld uit fig. 34, met grote aantallen plasmablasten en onrijpe plasmacellen. Vergr.: 800 \times .

scheidene mitosen vertoonden; phagocyterende reticulumcellen met „tingibele Körper” waren onveranderd aanwezig.

Na 3×24 uur was het aantal plasmablasten en onrijpe plasmacellen aan de randen van de lymphocytenvelden en in de mergstrengen zeer groot, evenals 24 uur eerder. Door de verder voortschrijdende differentiatie overheersten nu de onrijpe plasmacellen, terwijl zich in de mergstrengen ook al rijpe plasmacellen ontwikkelden. Naast „openbrekende” lymphocytenvelden werden mergsinussen gevonden, die nog steeds jonge pyroninophile cellen bevatten. Opvallend was dat het aantal lymphocyten in het midden van de lymphocytenvelden weer was toegenomen. Het follikelbeeld toonde weinig veranderingen.

Na 4×24 uur was nog slechts een klein aantal plasmablasten en onrijpe plasmacellen aanwezig in de periferie van de lymphocytenvelden; in de centrale delen der lymphocytenvelden kwamen temidden van de weer in aantal toegenomen lymphocyten geen plasmocytaire elementen meer voor. In de mergstrengen daarentegen werden nu in grote aantallen

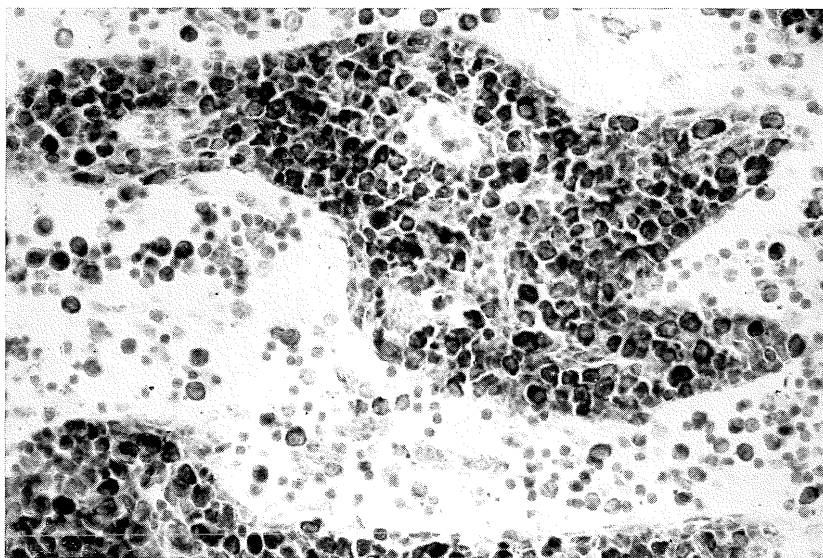


Fig. 36. Sterkere vergroting uit fig. 34 van het merggebied linksonder; groot aantal jonge plasmacelvormen in mergstreng en mergsinus. Vergr.: 370 \times .

rijpe plasmacellen gevonden met daartussen nog slechts enkele jongere vormen. Ondanks de aanwezigheid van „openbrekende” lymphocytenvelden kwamen er slechts weinig jonge pyroninofiele cellen meer voor in de mergsinussen. Het follikelbeeld was gelijk gebleven.

Na 5 *dagen* werd het beeld van de plasmacellulaire reactie geheel beheerst door de grote aantallen rijpe plasmacellen in de mergstrengen; hiertussen kwamen nog slechts enkele onrijpe plasmacellen voor. Het aspect van de lymphocytenvelden was weer geheel normaal; pyroninofiele cellen werden er niet meer gevonden. Ook in deze normale lymphocytenvelden kwamen weer „openbrekende” gebieden voor, uiteraard zonder dat dit tot vrijkomen van plasmocytaire elementen in de sinussen leidde. De follikels vertoonden nog steeds hetzelfde beeld; mogelijk was de mitotische activiteit iets toegenomen.

Na 6 *dagen* was het beeld gelijk aan dat van de 5e dag.

Samenvatting en discussie.

De plasmacellulaire reacties, welke tijdens de „secondary response” op

PGG in de popliteale lymphklier werden gevonden, waren de sterkste welke in deze serie proeven werden waargenomen; het aantal plasmocytaire elementen, dat in de loop van een viertal dagen tot ontwikkeling kwam was enorm; hiermee correspondeerde een eveneens enorme stijging van de antilichaamtiter in het bloed.

Ook deze plasmacellulaire reacties spelen zich weer primair af in de schors van de lymphklier. Reeds in de eerste 24 uur na de tweede antigeeninjectie komen in de lymphocytenvelden al zeer vele „transitional cells” en plasmablasten tot ontwikkeling; een deel van deze cellen ligt weer op karakteristieke wijze gegroepeerd aan de bases van de follikels, andere liggen verspreid in de lymphocytenvelden. Daarnaast verschijnen ook al in deze eerste 24 uur plasmablasten in mergstrengen. Gedurende de volgende twee dagen komen in massale aantallen jonge plasmacellen tot ontwikkeling zowel in de lymphocytenvelden als in de mergstrengen. Wat dit laatste punt betreft, het volgende:

Ook in deze serie proeven werd weer regelmatig het „openbreken” van lymphocytenvelden waargenomen. Doordat in deze lymphocytenvelden al gedurende de eerste dag vele plasmablasten ontstaan, verschijnen — als gevolg van het „openbreken” van dergelijke velden — ook al in een vroeg stadium (24 u.) plasmablasten in nieuw gevormde mergstrengen en komen deze vrij in nieuw gevormde sinussen. Door het enorme aantal plasmablasten dat tussen de 1e en de 3e dag in de velden tot ontwikkeling komt is ook het aantal jonge plasmacellen, dat na het „openbreken” in mergstrengen achterblijft en hier tot rijpe plasmacellen differentieert, veel groter dan bij de „primary response”; ook het aantal plasmocytaire elementen, dat bij het „openbreken” vrij komt en de lymphklier verlaat, is veel groter. Het is niet uitgesloten dat in het begin van de reactie een aantal plasmablasten in reeds bestaande mergstrengen tot ontwikkeling komt.

Wanneer men ook nu weer ziet dat de sterkste stijging van de antilichaamtiter in het bloed tussen de 4e en de 6e dag plaats heeft, lijkt de conclusie gerechtvaardigd dat ook de rijpe plasmacellen een aanzienlijke bijdrage leveren in de antilichaamsynthese. Het lijkt bovendien waarschijnlijk dat ook de plasmacellen, welke de lymphklier bij het „openbreken” van de lymphocytenvelden in grote getale verlaten, elders — waar ze ook terecht komen (longen, beenmerg?) — aan de antilichaamvorming medewerken.

In vergelijking met de „primary response” op PGG is het duidelijk dat de plasmacellulaire reactie van de „secondary response” veel sneller begint en verloopt — na 24 uur worden al vele mitosen van plasmocyttaire elementen gevonden — en veel sterker is. Daarnaast is er echter ook een verschil in localisatie van de eerst verschijnende „transitional cells” en plasmablasten. Bij de „primary response” op PGG ontstonden deze cellen in groepjes, verspreid door de lymphocytenvelden; bij de „secondary response” was er duidelijk een voorkeurslocalisatie aan de bases van de follikels. Het lijkt niet uitgesloten dat dit verschil in localisatie samenhangt met het, overigens nog onbekende, verschil in mechanisme van „primary” en „secondary response”, waarbij wellicht de follikels, en de follikelcentrumreacties die na de eerste antigeentoeiening optreden, een functionele betekenis zullen blijken te hebben. In dit geval zou moeten worden aangenomen, dat de „primary response” op paratyphus vaccin — waarbij de eerst verschijnende „transitional cells” en plasmablasten steeds aan de bases van de follikels waren gelocaliseerd — in werkelijkheid een „secondary response” is geweest, ondanks de afwezigheid van een begin-titer in deze proeven. De mogelijkheid, dat proefdieren tevoren „natuurlijke” contacten met paratyphus antigeen hebben gehad, is zeker niet denkbeeldig. Dit zou ook een verklaring kunnen geven voor de sterke plasmacellulaire reacties, welke bij zogenaamde „primary response” op paratyphus steeds worden gevonden na vaccin-doses (0,1 — 0,2 ml), die in feite niet meer dan minimale hoeveelheden paratyphus antigenen bevatten.

De follikelreacties waren, evenals tijdens de „secondary response” op paratyphus vaccin, moeilijk te beoordelen omdat de follikelcentra klaarblijkelijk nog niet tot rust waren gekomen na de eerste antigeentoeiening. Gedurende de hele „secondary response” bleven de „medium-sized” lymphocyten in de centra overheersen en werden er blast-type cellen gevonden; ook de mitotische activiteit van deze cellen bleef voortduren, terwijl daarnaast steeds phagocyterende reticulumcellen met „tingibele Körper” aanwezig waren.

DE „PRIMARY RESPONSE” BIJ SUBLETHAAL BESTRAALDE DIEREN

Uit proeven, welke zijn verricht in het Histologisch Laboratorium te Groningen en welke nog maar gedeeltelijk zijn gepubliceerd (LANGE-

VOORT e.a. 1961), is gebleken, dat door een totale lichaamsbestraling, in een dosis van 450 r, in milt en lymfklieren een vrijwel selectieve en onmiddellijke destructie van de follikels wordt veroorzaakt. Onder bepaalde omstandigheden werd daarbij na intraveneuze injectie van het antigeen een nagenoeg normale antilichaamvorming en in de milt een eveneens vrijwel normale plasmacellulaire reactie gevonden.

De volgende proeven-serie werd uitgevoerd met de bedoeling onder soortgelijke omstandigheden, waarbij dus de follikels worden uitgeschakeld, de plasmacellulaire reactie in de popliteale lymfklier te onderzoeken en deze naar localisatie en antilichaamvorming te vergelijken met de „primary response” van niet bestraalde dieren.

Materiaal en methoden.

Bestraling. Een Philips 250 k.V. therapie-toestel werd gebruikt bij 200 k.V. en 20 mA. met een filter van 1 mm. Cu. De H.V.L. was hierbij 1,45 mm. Cu. De dieren werden bestraald in een doos van triplex, welke precies in de stralenbundel paste. De ene helft van de bestraling werd van links, de andere helft van rechts gegeven. Op deze wijze kregen de dieren een min of meer homogene bestraling van 450 r., inclusief de strooi-straling.

Antigeen. 0,2 ml. Paratyphus B(H) vaccin werd subcutaan in de linker achterpoot ingespoten. Bij de dieren, welke zowel paratyphus vaccin als een röntgenbestraling kregen, werd het antigeen *vlak voor de bestraling* toegediend.

Experimenten.

In totaal werden 8 konijnen gebruikt, verdeeld in vier groepen van 2 dieren. Van alle dieren werd vóór het begin van de proef de antilichaamtiter in het bloedserum bepaald. 2 Konijnen — onbestraalde titerdieren — kregen alleen antigeen; daarna werd de antilichaamtiter in het bloed gedurende 3 weken gevolgd. 2 Konijnen — bestraalde titerdieren — kregen antigeen en werden onmiddellijk daarna bestraald; vervolgens werd ook bij deze dieren de antilichaamtiter gedurende 3 weken gevolgd.

2 Konijnen kregen antigeen en werden onmiddellijk daarna bestraald; van deze dieren werd na 4 dagen de linker popliteale lymfklier weggeno-

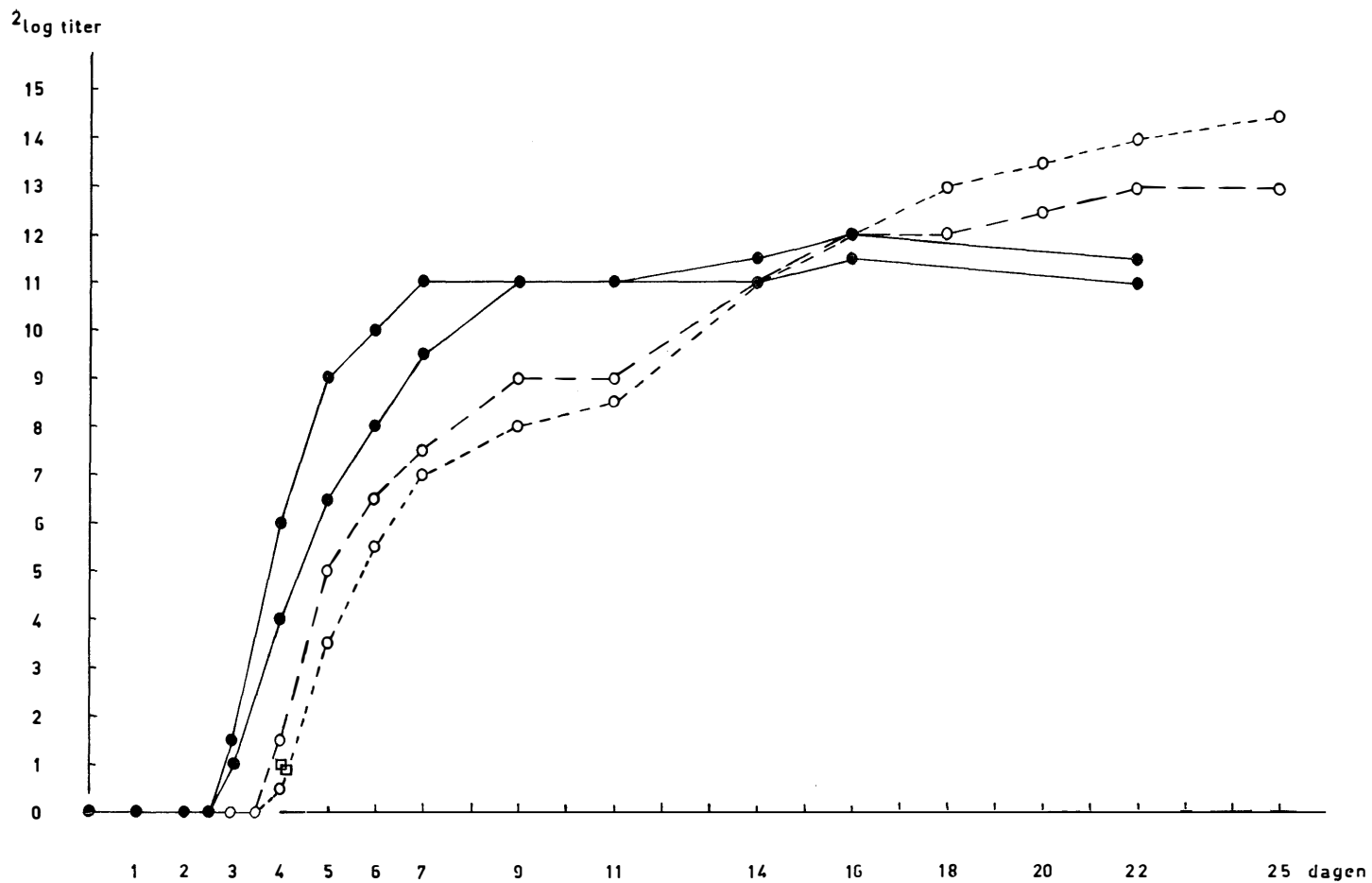


Fig. 37. „Primary response”, paratyphus vaccin; bestraling direct na antigeen. Verloop van de antilichaamtiter in het bloedserum; getrokken lijnen: onbestraalde controles; stippellijn: bestraalde dieren.

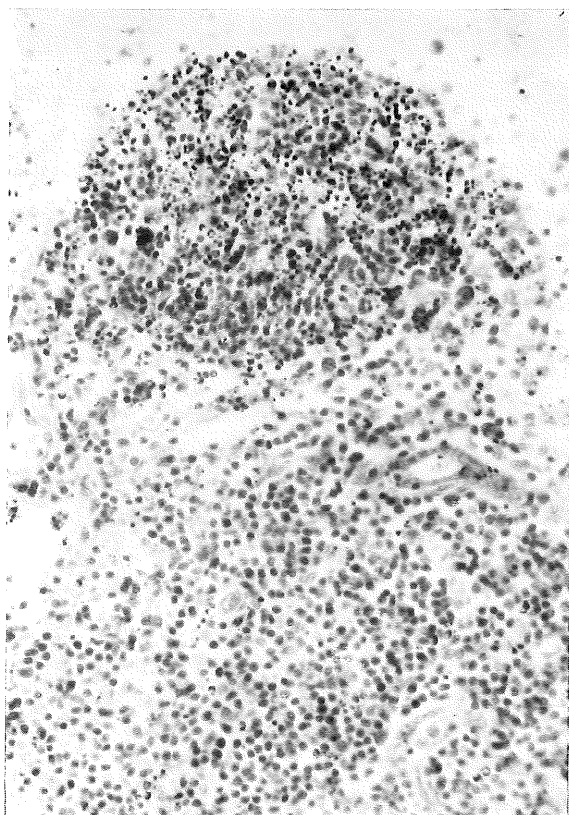


Fig. 38. Röntgenshade; 5 uur na 400 r totale lichaamsbestraling. In follikel sterk, in lymphocytenveld gering celverval. Vergr.: 300 \times .

men voor histologisch onderzoek en de antilichaamtiter in het bloedserum bepaald; de rechter popliteale lymphklier werd, ter controle van de bestralingsschade, reeds 24 u. na de bestraling weggenomen voor histologisch onderzoek. 2 Konijnen, tenslotte, kregen eveneens antigeen en werden onmiddellijk daarna bestraald; van deze dieren werd na 4 $\frac{1}{2}$ dag zowel de linker als de rechter popliteale lymphklier weggenomen en de antilichaamtiter in het bloedserum bepaald.

Van een grote serie konijnen stonden praeparaten ter beschikking van

de lymphoïde organen, weggenomen op uiteenlopende tijdstippen na bestraling.

Resultaten.

In fig. 37 zijn de gevonden *antilichaamtiters* uitgezet. Geen van de dieren bleek vóór het begin van de proef een serumtiter te vertonen. De getrokken lijnen geven het titerverloop van de onbestraalde titerdieren weer; dit titerverloop correspondeert geheel met dat van de titerdieren in fig. 6 (pag. 24) en 15 (pag. 34), al blijft de stijgingsgraad bij een van de dieren iets achter. Het titerverloop van de bestraalde titerdieren is weergegeven door de gestippelde lijnen. Het blijkt dat de antilichaamvorming in deze dieren aanvankelijk iets achter blijft; na het bereiken van een tussentijds „plafond” omstreeks de 10e dag, begint de titer echter opnieuw te stijgen, waarbij hogere waarden worden gevonden dan bij de onbestraalde controles. Eenzelfde vorm van de titercurve wordt ook steeds gevonden na intraveneuze injectie van paratyphus vaccin, onmiddellijk gevolgd door 500 r. bestraling (LANGEVOORT C. S.: 1961 en niet eerder gepubliceerde waarnemingen).

Het *microscopische beeld* van lymphklieren, weggenomen na een totale lichaamssbestraling van 400—500 r., vertoont reeds enkele uren na de bestraling een sterk lymphocytenverval, echter vrijwel uitsluitend in de follikels. Fig. 38 toont de schors van een lymphklier 5 uur na de bestraling: in de follikel is al een sterke destructie van de lymphocyten te zien, maar in het lymphocytenveld zijn de cellen nagenoeg onaangetast. Na 24 uur is van de follikels slechts een conglomeraat van licht gekleurde reticulumcellen over, terwijl de lymphocytenvelden intact zijn, al is het aantal lymphocyten duidelijk verminderd. In de mergstrengen lijkt het aantal rijpe plasmacellen meestal wat groter dan normaal.

De controle-lymphklieren uit onze eigen serie, welke 24 uur resp. 4½ dag na antigeentoeediening (in linker achterpoot) + bestraling uit de rechter achterpoot werden weggenomen, bleken niet merkbaar door het antigeen beïnvloed te zijn. De röntgenshade vertoonde het zo juist beschreven beeld. Alleen bleken in de na 4½ dag weggenomen lymphklieren enkele follikels niet volledig gedestrueerd te zijn, of al een begin van regeneratie te vertonen; ze bevatten kleine conglomeraten van intacte lymphocyten, soms van het „medium-sized”-type.

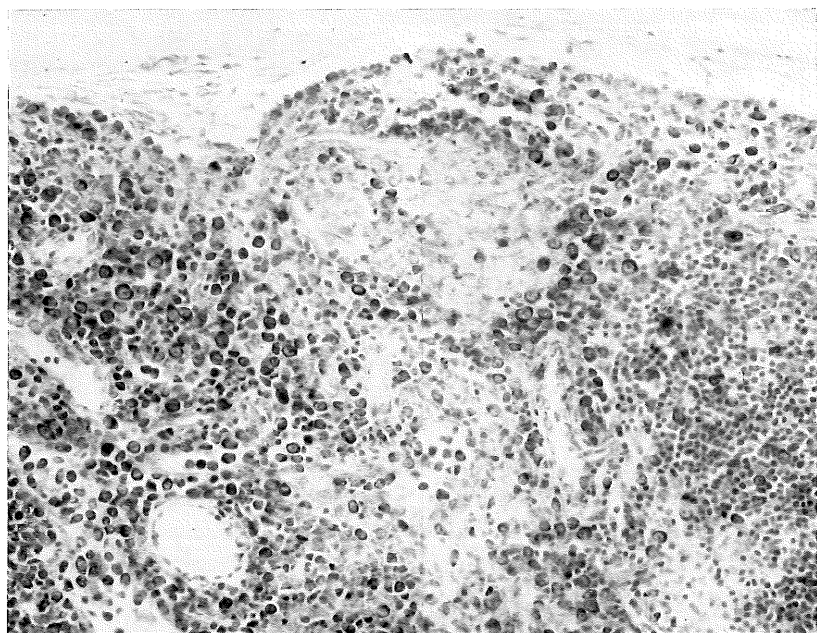


Fig. 39. „Primary response”, paratyphus vaccin; bestraling direct na antigeen; 4 × 24 uur na antigeen. Groot aantal plasmablasten en onrijpe plasmacellen; follikel gedegeneerd. Vergr.: 210 ×.

De *microscopische beelden* van de *linker* popliteale lymphklieren, welke 4 respectievelijk 4 $\frac{1}{2}$ dag na de antigeentoediening (in *linker* achterpoot) plus bestraling waren weggenomen kwamen geheel met elkaar overeen.

De bestralingsschade was dezelfde als in de controle-lymphklieren. De follikels waren bijna alle volledig gedegeneerd tot kleine, licht gekleurde ophopingen van reticulumcellen; slechts een enkele follikel bevatte een aantal dichtopeen liggende kleine of „medium-sized” lymphocyten. In de lymphocytenvelden van de schors lagen verspreid een groot aantal plasmablasten en onrijpe plasmacellen. Ook in de aangrenzende mergstrengen werden deze cellen aangetroffen, hier liggende tussen rijpe plasmacellen, waarvan het aantal groter was dan in de controles. Het hele beeld was dat van een floride plasmacellulaire reactie. In fig. 39 is een stukje schors van een dezer lymphklieren afgebeeld. In deze figuur is een follikelrest zonder een enkele lymphocyt waarneem-

baar en door het veld verspreid de talrijke plasmablasten en onrijpe plasmacellen. Het maakt de indruk of parallel aan de ontwikkeling van deze jonge plasmocytaire elementen het aantal kleine lymphocyten in het lymphocytenveld is afgenomen; geheel rechts is nog een gebied te zien waar uitsluitend lymphocyten liggen.

Samenvatting en discussie:

Indien aan konijnen een totale lichaamsbestraling van 450 r wordt gegeven onmiddellijk na een subcutane injectie van paratyphus vaccin wordt hierdoor de antilichaamvorming nauwelijks belemmerd en wordt ook een vrijwel normale plasmacellulaire reactie gevonden in de regionale lymphklier. Dit correspondeert dus geheel met de resultaten van LANGEVOORT c.s. (1961), waarbij de plasmacellulaire reactie in de milt niet gestoord bleek te worden door 500 r. totale lichaamsbestraling, gegeven onmiddellijk na de (intraveneuze) antigeeninjectie.

Aangezien door deze bestraling vrijwel selectief een onmiddellijke destructie van de lymphocyten in nagenoeg alle follikels wordt veroorzaakt — slechts van een enkele follikel werden mogelijk niet alle lymphocyten gedood — is het duidelijk, dat de follikels niet direct in de antilichaamvorming betrokken zijn, noch een directe rol spelen bij het ontstaan van de jonge plasmacellen. Deze bestralingsproeven bevestigen dus het resultaat van de overige proeven, nl. dat de plasmacellulaire reactie in de lymphklier primair tot ontwikkeling komt in de lymphocytenvelden van de schors.

Voor de eigenaardige verschillen in het verloop van de antilichaamtiteren in bestraalde en niet-bestraalde dieren kan op grond van de hier beschikbare gegevens geen verklaring worden gegeven.

DE PLAATS VAN DE PLASMACELLULAIRE REACTIE
IN DE
HISTOPHYSIOLOGIE VAN DE LYMPHKLIER

Het onderzoek, dat in dit proefschrift is beschreven, heeft aan het tot nu toe bekende beeld van de plasmacellulaire reactie een aantal nieuwe elementen toegevoegd. Deze maken het noodzakelijk de gehele histofysiologie van de lymphklier aan een nadere beschouwing te onderwerpen.

Tot nu toe werd algemeen aangenomen, dat de plasmacellulaire reactie in de lymphklier gelocaliseerd is in de mergstrengen. Uit ons onderzoek is daarentegen gebleken, dat de eerste phase van de plasmacellulaire reactie zich afspeelt in de schors van de lymphklier en dat pas in een tweede phase mergstrengen in het proces worden betrokken. De eerste plasmablasten ontwikkelen zich, reeds na 24 uur, in de lymphocytenvelden van de schors temidden van de lymphocyten. Mitosen worden op dit moment in deze cellen niet waargenomen. Het aantal jonge plasmocyttaire elementen neemt gedurende de volgende twee à drie dagen sterk toe, waarbij tegelijkertijd een differentiatie, eerst tot onrijpe en daarna tot rijpe plasmacellen, wordt gevonden. Tijdens dit proces worden vele mitosen van deze cellen aangetroffen.

Evenals in de normale lymphklieren, waarin zich dus geen plasmacellulaire reactie afspeelt, zijn ook hier de lymphocytenvelden onderworpen aan een proces, dat door ons is aangeduid als het „openbreken” van de lymphocytenvelden. Een lymphocytenveld transformeert hierbij in een merggebied, bestaande uit mergstrengen en mergsinussen. Dit „openbreken” lijkt een gevolg te zijn van het oplossen van het reticulaire verband der reticulumcellen in deze lymphocytenvelden. In de normale lymphklier heeft dit tot gevolg, dat een groot aantal lymphocyten en een aantal uit reticulumcellen ontstane macrophagen vrij in de nieuwgevormde sinussen komen te liggen; resten van het lymphocytenveld blijven voornamelijk rondom het vaatpatroon achter als mergstrengen. In een lymphklier waar zich een plasmacellulaire reactie afspeelt heeft ditzelfde proces tot gevolg, dat ook vele plasmablasten en onrijpe plasmacellen vrij in de nieuwgevormde mergsinussen komen te liggen, ter-

wijl in de nieuwgevormde mergstrengen naast lymphocyten nu ook jonge plasmacellen achterblijven. Deze laatste vormen uiteraard slechts een klein gedeelte van het tevoren in het lymphocytenveld aanwezige totale aantal van deze cellen. Het is dus op deze wijze, dat plasmocytaire elementen in de mergstrengen terechtkomen. Na een „primary response” wordt slechts een gering aantal plasmacellen in de mergstrengen aange troffen; na een „secondary response”, waarbij veel grotere aantallen jonge plasmacellen tot ontwikkeling komen, is ook het aantal plasmacellen, dat in de mergstrengen achterblijft, veel groter. Het lijkt niet uitgesloten, dat bij de „secondary response” bovendien een aantal plasmablasten tot ontwikkeling komt in reeds bestaande mergstrengen.

Wanneer men het beeld van de plasmacellulaire reactie in de lymphklier vergelijkt met de door LANGEVOORT c.s. (1961) beschreven plasmacellulaire reactie in de milt, dan blijkt een sterke overeenkomst te bestaan. Na intraveneuze antigeentoediening verschijnen in de milt de eerste plasmablasten — eveneens na 24 uur — in de periarteriolaire lymphocytenscheden van de witte pulpa, ook hier aanvankelijk met een zekere voorkeurslocalisatie aan de bases van de follikels. Deze plasmablasten en onrijpe plasmacellen verplaatsen zich naar de buitenzijde van de lymphocytenscheden, waarna de meeste via de bloedsinussen worden afgevoerd en slechts een klein aantal als rijpe plasmacellen achterblijft in de kleinste uitlopers van de witte pulpa in de strengen van Billroth. Ook in de milt begint na $\pm 3 \times 24$ u. een follikelcentrum-reactie. Tenslotte werd ook hier een nagenoeg normale plasmacellulaire reactie en antilichaamvorming gevonden, indien onmiddellijk na de antigeeninjectie een sublethale röntgenbestraling werd gegeven.

In de, als controles gebruikte, normale *popliteale lymphklieren* werden, op een enkele uitzondering na, slechts geringe tekenen van plasmacellulaire reacties waargenomen: alleen in de mergstrengen kwamen rijpe plasmacellen voor, in de lymphocytenvelden een sporadische jonge plasmacel. De normale *mesenteriale lymphklieren* daarentegen vertoonden steeds het beeld van een bijzonder sterke plasmacellulaire reactie, in sterkte vergelijkbaar met de beelden zoals die bij de „secondary response” werden beschreven. Dit betekent, dat men de mesenteriale lymphklier niet als representatief mag beschouwen voor de „normale” lymphklier! De oorzaak van dit afwijkende beeld van de normale me-

sentierale lymphklier moet waarschijnlijk worden gezocht in de voortdurende aanvoer van antigenen uit het darmkanaal.

Dit punt is van grote betekenis voor de beoordeling van de histofysiologie van de lymphklier en met name van het proces der lymphocytopoiese. Het is immers duidelijk, dat de veranderingen in de lymphocytenvelden van de schors, welke de eerste phase vormen van een plasmacellulaire reactie, tot nu toe òf niet zijn gezien òf zijn beschouwd als lymphocytopoiese. Vooral het feit, dat men de processen in de schors van de mesenteriale lymphklier niet heeft herkend als onderdelen van een voortdurende plasmacellulaire reactie, heeft geleid tot de interpretatie van deze processen als lymphocytenvorming. Als plaatsen van lymphocytopoiese worden dan ook in de lymphklier aangegeven zowel de *lymphocytenvelden*, waarin met name in de mesenteriale lymphklieren blast-type cellen en celdelingen in groten getale werden waargenomen, als de *follikels*, in het bijzonder de follikelcentra, welke reeds door FLEMING in 1885 als plaatsen van lymphocytenvorming werden beschouwd.

Uit ons onderzoek is gebleken, dat de *lymphocytenvelden* van de normale popliteale lymphklier geen tekenen van lymphocytopoiese vertonen: er worden noch blast-type cellen, noch mitosen gevonden; de lymphocytenpopulatie bestaat uitsluitend uit kleine lymphocyten. In de op antigeen reagerende lymphklieren, waar blast-type cellen in de lymphocytenvelden verschijnen en iets later ook een mitotische activiteit van deze cellen wordt waargenomen, is dit duidelijk de uiting van een nieuwvorming van plasmacellen. Of mogelijk een gedeelte van de blast-type cellen op minder opvallende wijze tot lymphocytenvorming aanleiding geeft, is niet a priori uit te sluiten. Gedurende de beginphase van de plasmacellulaire reactie worden hier een aantal lymphoïde cellen gevonden (zie fig. 40, pag 82), die een zekere overeenkomst vertonen met de „medium-sized” lymphocyten en dus eventueel als voorstadia van de kleine lymphocyt zouden kunnen worden opgevat. Er is echter reden om aan te nemen, dat deze elementen een geheel andere betekenis hebben, een punt, waarop aan het eind van dit hoofdstuk nader zal worden ingegaan. Het is in ieder geval zeker, dat in de normale popliteale lymphklier geen lymphocytenvorming in de lymphocytenvelden plaats heeft.

Ten aanzien van de lymphocytopoiese in de *follikels* kan worden opgemerkt, dat in de normale popliteale lymphklieren de follikelcentra een opvallend rustig, indifferent beeld vertonen. Alleen aan de naar het merg

toegekeerde zijde liggen in deze centra gewoonlijk enige „medium-sized” lymphocyten, terwijl sporadisch een blast-type cel en een enkele mitose wordt aangetroffen. In een normale lymphklier komen alleen deze plaatsen in aanmerking als plaatsen van mogelijke lymphocytopoiese. Hieruit volgt dus, dat in normale lymphklieren de lymphocytenvorming slechts minimaal kan zijn.

Een grote activiteit van de follikelcentra ontwikkelt zich in de lymphklier daarentegen drie dagen na een antigeeninjectie („primary response”). Dit begint met het verschijnen van blast-type cellen, welke op de vierde dag de follikelcentra bijna geheel vullen. De oorsprong van deze cellen blijft hier buiten beschouwing. In de daarop volgende dagen neemt het aantal blast-type cellen weer af en verschijnen grote aantallen „medium-sized” lymphocyten, terwijl er veel mitosen worden waargenomen; het lijkt alsof zich vervolgens een evenwicht instelt tussen het aantal blast-type cellen en het aantal „medium-sized” lymphocyten. Temidden van deze cellen vinden we nu ook de typische tekenen van celverval in de vorm van de zg. „tingibele Körper”, kernresten opgenomen in phagocyterende reticulumcellen, waardoor het follikelcentrum het typische „sterrenhemel”-beeld krijgt. De blast-type cellen en „medium-sized” lymphocyten vertonen een sterke overeenkomst met die, welke in de thymus voorkomen en daar nauwelijks anders dan als tekenen van lymphocytopoiese kunnen worden geïnterpreteerd (LEBLOND en SAINTE-MARIE; 1960). Als deze follikelcentrumreactie inderdaad de betekenis heeft van lymphocytopoiese, wat weliswaar nog niet bewezen geacht kan worden, maar toch wel zeer waarschijnlijk is, betekent dit, dat deze lymphocytenvorming een direct of indirect gevolg is van de antigeentoediening. Op de mogelijke betekenis hiervan in het kader van de „antibody response” kan pas worden ingegaan, nadat de eventuele rol van de lymphocyt in dit verband ter sprake is gekomen aan het eind van dit hoofdstuk.

Uit het voorgaande blijkt, dat de processen, welke zich in de schors van de lymphklier afspelen als onderdeel van de plasmacellulaire reactie, niet als zodanig zijn herkend, maar ten onrechte zijn geïnterpreteerd als lymphocytopoiese. Bovendien is gebleken, dat in de „normale” lymphklier de lymphocytenvorming slechts minimaal is. Deze beide punten dwingen tot een nieuwe beoordeling van de dynamiek van het lymphoïde systeem als geheel, welke nl. enerzijds bepaald wordt door de omvang

van de lymphocytenvorming en anderzijds door de mate van lymphocyten-recirculatie. Deze dynamiek van het lymphoïde systeem zelf is weer van betekenis voor de beoordeling van het gebeuren in de lymphklier.

De omvang van de lymphocytenvorming in het lymphoïde weefsel heeft men op verschillende manieren benaderd. KINDRED (1942a; zie ook ANDREASEN en CHRISTENSEN, 1949) telde het aantal mitosen in de lymphoïde organen van de rat. Het grootste aantal celdelingen werd daarbij steeds gevonden in de thymus. In de lymphklier bepaalde hij weliswaar het aantal mitosen in de verschillende delen van het orgaan afzonderlijk, maar hij geeft het totaal op als lymphocytenproductie. Dit is, hoewel kleiner dan in de thymus, toch nog zeer groot. Hierbij kan direct worden opgemerkt, dat in de *thymus*, althans in het thymusparenchym, geen plasmacellulaire reacties voorkomen, zodat het aantal mitosen een vrij betrouwbare maat is voor de lymphocytenvorming. De *lymphklieren* van de rat daarentegen vertonen vrijwel steeds zeer sterke plasmacellulaire reacties, vermoedelijk een gevolg van de infecties, waarmee deze dieren steeds zijn behept. Aangenomen mag dus worden dat de lymphocytenproductie in de lymphklier door KINDRED in belangrijke mate is overschat.

Door YOFFEY, HANKS en KELLY (1958; zie ook ANDREASEN en OTTESEN, 1944), werd langs indirecte weg, nl. uit de „turn-over” van het deoxyribose nucleïnezuur na toediening van P^{32} -fosfaat, de celproductie in de lymphoïde organen van de cavia bepaald. Deze celvorming werd zonder meer geïnterpreteerd als lymphocytenvorming. Volgens deze onderzoeken zouden in de thymus per uur $19,6 \times 10^6$ lymphocyten per 100 mg. weefsel ontstaan, in de mesenteriale lymphklier $25,0 \times 10^6$ (!), in de milt $14,0 \times 10^6$ en in de cervicale lymphklier $11,0 \times 10^6$. De hoge productie in de mesenteriale lymphklier is begrijpelijk als men op de hoogte is met de sterke plasmacellulaire reactie, die in dit orgaan voortdurend wordt gevonden. YOFFEY c.s. geven geen verklaring voor deze opvallend hoge „lymphocytenproductie” in de mesenteriale lymphklier. Ook op grond van dit onderzoek mag dus worden aangenomen, dat de sterkste lymphocytenvorming in de thymus plaats heeft.

Op gelijke wijze als YOFFEY c.s. bepaalden SCHOOLEY, BRYANT en KELLY (195) de celnieuwvorming in de lymphoïde organen van de muis. De grootste productie, $1,7 \times 10^6$ cellen per uur, vonden ook zij weer in

de thymus. In de lymphklieren varieerde de celproductie van $0,63$ tot $0,94 \times 10^6$ cellen per uur. De schrijvers merken hierbij op, dat het niet vaststaat, dat al deze nieuwgevormde cellen lymphocyten zijn, zonder zich erover uit te laten, wat voor cellen het dan wel zouden kunnen zijn.

Een geheel andere methode, die niet direct een maat is voor het aantal nieuwgevormde lymphocyten, maar die een indruk geeft van het aantal lymphocyten, dat de bloedbaan bereikt, is het meten van de z.g. „output” van lymphocyten van de gecanuleerde d. thoracicus. YOFFEY en COURTICE (1956) geven in hun boek over het lymphoïde systeem een overzicht van de resultaten die met deze methode zijn bereikt. Men komt onder de indruk van het grote aantal lymphocyten, dat gedurende 24 uur via de d. thoracicus in de bloedbaan terecht komt. Bij een konijn bijv. is dit aantal $5 \times$ groter dan het totaal aantal lymphocyten, dat op elk moment in de bloedbaan aanwezig is (SANDERS, FLOREY en BARNES 1940). HUGHES, MAY en WIDDICOMBE (1956) toonden aan, dat via andere wegen nog eens minstens de helft van het aantal d. thoracicus-lymphocyten de bloedbaan bereikt. Ondanks de grote cellenproductie, die in de lymphoïde organen werd gevonden, was men algemeen van mening, dat deze niet groot genoeg was om verantwoordelijk te kunnen zijn voor het enorme aantal cellen, dat via d. thoracicus en andere wegen de bloedbaan bereikt. Hieruit kwam naar voren de hypothese van de recirculatie van de lymphocyten, een mogelijkheid waarop reeds in 1936 door SÖVALL was gewezen.

De waarneming van EHRICH en HARRIS (1942), dat een aantal lymphocyten via de afferente lymphbanen de lymphklier binnenkomt, wijst op de mogelijkheid dat langs deze weg lymphocyten uit de bloedbaan de lymphklier bereiken. Een meer direct bewijs voor het bestaan van een recirculatie van lymphocyten werd geleverd door GOWANS (1957). Deze onderzoeker bracht bij de rat een fistel aan in de d. thoracicus, en bepaalde over een lange tijd het aantal lymphocyten in de opgevangen lympe. Dit aantal bleek na 24 uur sterk af te nemen. Werden vervolgens de uit de fistel afkomstige lymphocyten langs intraveneuze weg aan het dier teruggegeven dan steeg het aantal lymphocyten dat uit de fistel kwam; werden de lymphocyten daarentegen gedood en daarna aan het dier teruggegeven, dan nam de „output” uit de d. thoracicus niet toe. Deze verhoogde „output” bleek niet het gevolg te zijn van een toename van de lymphocytenvorming (GOWANS, 1959).

GOWANS meent, dat van de cellen, die via de d. thoracicus de bloedbaan bereiken, hoogstens tien procent nieuw gevormd is. Dit is in overeenstemming met de waarnemingen van SCHOOLEY c.s. (1959), EVERETT c.s. (1960a) en anderen, dat na toediening van H^3 -thymidine aan een proefdier slechts een gering percentage gelabelde, d.w.z. nieuw gevormde, lymphoïde cellen, in de d. thoracicus-lymphe wordt aangetroffen.

YOFFEY (1959), die aanvankelijk het bestaan van een recirculatie van de lymphocyt geheel verwierp, erkent nu, dat een zekere mate van recirculatie wel aangenomen moet worden, voornamelijk op grond van het voorkomen van lymphocyten in de afferente lymphbanen van de lymphklier (EHRICH en HARRIS, 1942). De proeven van GOWANS acht hij niet bewijzend voor een zo grote mate van recirculatie als door deze onderzoeker wordt aangenomen; hij meent dat factoren als „stress” e.d. de resultaten kunnen hebben beïnvloed. Deze factoren kunnen o.i. echter onmogelijk een verklaring geven voor het meest positieve in de proeven van GOWANS, nl. de stijging in de lymphocyten-„output” van de d. thoracicus na teruggave van de opgevangen levende lymphocyten. Concluderende lijkt het toch het meest waarschijnlijk, zoal niet bewezen, dat de hoge schatting door GOWANS van de recirculatie der lymphocyten de werkelijkheid het dichtst benadert.

De cellen, die niet door recirculatie maar als *nieuwgevormde* elementen in de d. thoracicus verschijnen, zijn van verschillende herkomst. Een deel zal bestaan uit nieuw gevormde *lymphocyten*. Hiervan zal ongetwijfeld een zeer groot gedeelte afkomstig zijn van de thymus. Daarnaast is waarschijnlijk een aantal lymphocyten aanwezig, dat in aansluiting op plasmacellulaire reacties in de follikels van verschillende lymphoïde organen wordt gevormd en vervolgens via de d.thoracicus in circulatie komt; de hoeveelheid hiervan is moeilijk te schatten. Een tweede deel zal bestaan uit *plasmocytaire elementen*, welke tijdens de plasmacellulaire reacties in verschillende lymphoïde organen, vooral die welke met het maagdarmkanaal zijn geassocieerd, vrij komen. Van deze plasmocytaire elementen is het niet waarschijnlijk dat ze recirculeren; het valt aan te nemen, dat deze cellen na eenmaal de bloedbaan te hebben bereikt deze vrij snel zullen verlaten (longen, beenmerg?). Ten opzichte van het totale aantal kleine lymphocyten in de d.thoracicus zal hun aantal betrekkelijk gering zijn; WESSLEN (1952) telde in de d.thoracicus-lymphe van geïmmuniseerde konijnen slechts 5—6% grote lymphoïde elementen.

Die cellen, waarvan de aanwezigheid in de d.thoracicus een gevolg is van *recirculatie*, moeten in de d.thoracicus-lymphe terecht zijn gekomen via het lymfhoïde systeem, met name via de lymfhoïde organen. Indien de conclusies van GOWANS omtrent de omvang der recirculatie de werkelijkheid ook maar benaderen, betekent dit dat een groot aantal lymphocyten uit de bloedbaan terugkeert naar de lymfhoïde organen en vervolgens deze organen weer verlaat, om via efferente lymphbanen en d. thoracicus (eventueel ook langs andere wegen) de bloedbaan weer opnieuw te bereiken. In de milt zal dit proces alleen kunnen geschieden in directe uitwisseling met het bloed; van de thymus is niet bekend of daarin lymphocyten vanuit de bloedbaan terugkeren.

Voor de normale lymphklier is de consequentie van het hier geschetste beeld van de recirculatie, dat het aantal lymphocyten, dat dit orgaan vanuit de circulatie bereikt en daarna weer verlaat, groter zal moeten zijn dan het aantal lymphocyten, dat in deze lymphklier nieuw wordt gevormd. Deze veronderstelling vindt steun in onze waarnemingen aan de normale popliteale lymphklier. De slechts minimale lymphocytopoïese in dit orgaan gevonden, kan onmogelijk verantwoordelijk zijn voor de vervanging van de aantallen lymphocyten, die o.a. door het „openbrekingsproces” uit de lymphocytenvelden vrijkomen en met de lymphe worden afgevoerd. De reconstitutie van lymphocytenvelden in deze lymphklier kan dus alleen berusten op een aanvoer van lymphocyten vanuit de bloedbaan. Voor de wijze, waarop lymphocyten vanuit de circulatie de lymphklier binnenkomen, lijken twee wegen open te staan: de afferente lymphbaan (EHRICH en HARRIS; 1942) en de „epitheloïde” venulen in de lymphocytenvelden. Wat dit laatste betreft, uit de aanwezigheid van lymphocyten in de merkwaardig gebouwde wand van deze venulen kan de richting van de migratie weliswaar niet worden afgeleid, maar het feit, dat in het lumen van deze venulen meer lymphocyten worden aangetroffen dan in het verdere verloop daarvan (de mergvenulen), zou erop kunnen wijzen dat het hier gaat om een emigratie uit de bloedbaan. In de op antigeen reagerende lymphklier, vooral tijdens de „secondary response” op PGG, is bovendien de reconstitutie van de lymphocytenvelden duidelijk te zien. Op de derde en vierde dag na antigeen, wanneer in de „openbrekende” gebieden van de lymphocytenvelden nog veel plasmacelvormen tussen de lymphocyten liggen, neemt in de rest van deze lymphocytenvelden het aantal lymphocyten sterk toe, waardoor ter plaatse nieuwe lym-

phocytenvelden tot ontwikkeling komen. Dit proces is juist in deze lymphklieren goed waarneembaar, doordat de resten van de oude lymphocytenvelden gemarkeerd zijn door grote aantallen onrijpe plasmacellen. Het zou denkbaar zijn, dat deze lymphocyten ontstaan zijn in de follikels, waar immers een follikelcentrumreactie op gang is gekomen. Het blijkt echter, dat deze toename van lymphocyten niet in het bijzonder aan de basis van de follikels, maar duidelijk centraal in de nieuw ontstaande lymphocytenvelden plaats heeft.

Hoewel het beeld van de recirculatie van de lymphocyten zeker nog niet volledig is en op een aantal detailpunten nog niet bewezen geacht kan worden, lijkt alles erop te wijzen, dat de lymphklier bestaat en zijn structuur handhaaft door opbouw en afbraak en door de dynamiek van zijn lymphocytenpopulatie, waarbij zich in grote lijnen het volgende beeld aftekent. Door de voortdurende aanvoer van lymphocyten, vermoedelijk direct met de bloedbaan, ontstaan of groeien de lymphocytenvelden. Na enige tijd komen deze lymphocyten voornamelijk door het „openbreken” van de lymphocytenvelden weer vrij in de nieuwgevormde sinussen, waarna ze met de lymfe worden afgevoerd. Hiermee gaan voortdurende structuurveranderingen van de lymphklier gepaard. De lymphocytenvelden moeten in dit beeld worden gezien als een tijdelijk depôt van recirculerende lymphocyten. Dit laatste is in overeenstemming met de waarneming van GOWANS, dat na canulering van de d.thoracicus de daling van de lymphocyten-„output” met een zekere vertraging optreedt en dat de stijging in de „output” na terug-gave van de opgevangen lymphocyten vrijwel dezelfde vertraging vertoont.

Men zou in dit verband kunnen spreken van een „homeostasis” van de lymphklier als orgaan.

In dit dynamische gebeuren in de lymphklier speelt zich, in reactie op antigeen, de plasmacellulaire reactie af. Juist in de lymphocytenvelden, waar een voortdurende wisseling van de lymphocytenpopulatie moet worden aangenomen, verschijnen de eerste plasmablasten. Het beschreven karakteristieke verdere verloop van de reactie komt tot stand doordat het beschreven patroon van veranderingen in deze lymphocytenvelden tijdens de plasmacellulaire reactie gehandhaafd blijft.

Tegen deze achtergrond krijgt de fundamentele vraag, uit welke cellen de nieuwgevormde plasmablasten ontstaan en welke betekenis de lymphocyt mogelijk hierbij heeft — het probleem van de „immunologically competent cell” — een veel wijdere strekking.

Afgezien van de theoretische mogelijkheid dat de plasmablasten, welke, 24 uur na antigeentoediening, in de lymphocytenvelden worden aangetroffen, van elders zouden zijn aangevoerd — een veronderstelling welke door geen enkel bekend feit wordt gesteund — komen als stamcel voor deze plasmablasten twee celtypen in aanmerking: de reticulumcel en de lymphocyt.

De *reticulumcel* is, vooral op gezag van MAXIMOW (1920), vele jaren beschouwd als de universele stamcel van zowel de myeloïde als de lymphoïde bloedelementen. Vele onderzoekers menen, dat ook de plasmacel uit de reticulumcel voorkomt. In zeker opzicht is dit een aantrekkelijke hypothese. De reticulumcel zou, na phagocytose van antigeen, „kennis dragen” van de specifieke eigenschappen van dit antigeen, en de uit deze cel voortkomende dochtercellen zouden zich daarna ontwikkelen tot plasmacellen, welke juist tegen dit antigeen antilichamen vormen. FAGRAEUS (1948) veronderstelt dat de, door haar als jongste celvorm in de plasmocytaire reeks beschreven, „transitional cell” een overgangsvorm is tussen de reticulumcel en plasmablast. Door MARSHALL en WHITE (1950) wordt dezelfde cel aangeduid als „activated reticular cell”; deze cel zou zich ontwikkelen tot plasmablast en vervolgens tot rijpe plasmacel. Zoals de naamgeving duidelijk uitdrukt zijn deze onderzoekers van mening, dat de „activated reticular cell” uit een reticulumcel ontstaat, in reactie op de antigeenprikkel. Vele onderzoekers verdedigen deze zelfde opvatting. De bewijskracht van het voornaamste argument voor deze hypothese, het feit dat de „transitional cell” of „activated reticular cell” morfologisch een tussenpositie inneemt tussen de reticulumcel enerzijds en de plasmablast anderzijds, is natuurlijk gering. Bovendien geeft deze hypothese geen verklaring voor het feit, dat de plasmacellulaire reactie juist in het lymphoïde weefsel wordt gevonden.

Tegenover de juist genoemde opvatting staan experimenten die wijzen op de *lymphocyt* als mogelijke stamcel voor de plasmacellen. Door HARRIS en HARRIS (1957) werden celsuspensies van lymphoïde organen, grotendeels bestaande uit lymphocyten en afkomstig van normale ko-

nijnen, in vitro met antigeen geïncubeerd en daarna ingespoten bij bestraalde onijnen. Voor de antilichaamvorming, die daarop bij deze laatste dieren werd gevonden, bleken de ingespoten cellen verantwoordelijk te zijn. Door STERZL (1959) werden soortgelijke proeven gedaan, waarbij als gastheren pasgeboren konijnen werden gebruikt die, evenals bestraalde volwassen dieren, niet tot antilichaamvorming tegen de betreffende antigenen in staat waren. DIXON, ROBERTS en WEIGLE (1957; zie ook overzichts-artikel door ROBERTS, 1960) hyperimmuniseerden konijnen tegen bovine serum albumine (B.S.A.); nadat het hoogtepunt van de antilichaamvorming voorbij was, werden celsuspensies van de lymphklieren, grotendeels bestaande uit lymphocyten, overgebracht op bestraalde receptor-dieren, die daarna een (I.V.) injectie met hetzelfde antigeen ontvingen. In de subcutane injectieplaatsen van deze celsuspensies werd daarop een sterke ontwikkeling van plasmacellen waargenomen, die anti-B.S.A.-antilichaam bleken te bevatten. Deze plasmacellenontwikkeling interpreteren zij als een transformatie van lymphocyten in plasmacellen. Soortgelijke resultaten werden beschreven door HOLUB (1960), die celsuspensies van lymphklieren insloot tussen permeabele membranen en zo inplanteerde bij receptor dieren. Al deze proeven wijzen in de richting van de lymphocyt als stamcel voor de plasmacel, al kan hiertegen worden ingebracht dat geen zuivere lymphocyten-suspensies werden gebruikt; in alle suspensies zijn zeker reticulumcellen aanwezig geweest, in het geval van DIXON c.s. ongetwijfeld ook rijpe plasmacellen.

Uit bestralingsproeven en proeven met beenmergbescherming na bestraling komt steeds weer de suggestie naar voren, dat het lymphoïde weefsel als zodanig onmisbaar is voor het vermogen tot antilichaamvorming. Een sterk argument voor de veronderstelling, dat de lymphocyt hierbij een belangrijke rol speelt, is gelegen in het feit, dat na bestraling — ook in sublethale dosering — tijdelijk geen lymphocytenvorming plaats heeft terwijl ook het vermogen op antigeentoediening te reageren met antilichaamvorming tijdelijk ontbreekt. Het bijzondere geval, waarin antigeen en bestraling nagenoeg tegelijkertijd worden gegeven en waarin wel antilichaamvorming wordt gevonden, is hiermee niet in tegenspraak (zie LANGEVOORT c.s., 1961).

Tegen de opvatting dat de lymphocyt de stamcel zou zijn van de plasmacellen wordt veelal aangevoerd dat in het lymphoïde weefsel geen overgangsvormen tussen lymphocyten en plasmablasten zouden voorkomen.

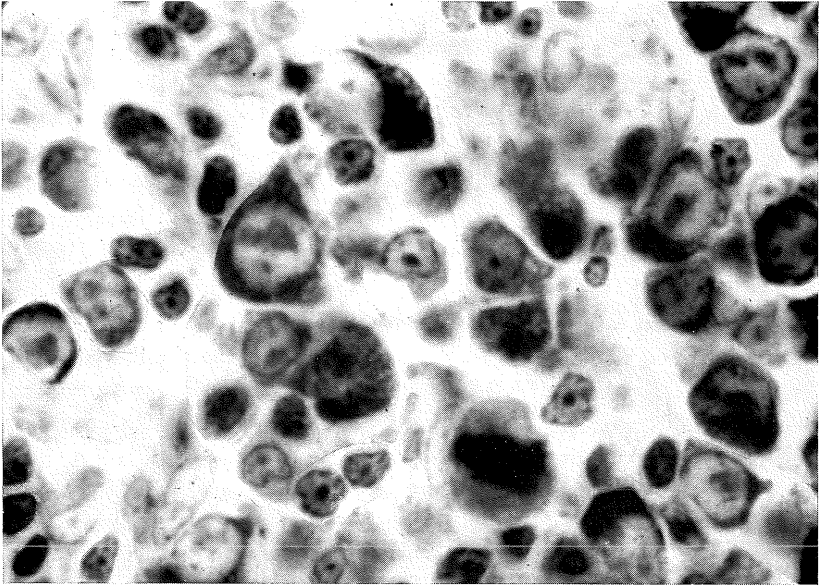


Fig. 40. Sterkere vergroting uit fig. 33 (pag. 60), van het gebied rechtsonder. Samengesteld uit vier foto's genomen met verschillende diepte-instelling. Lymphocyten, overgangscellen, „transitional cells” (FAGRAEUS), plasmablasten, mitosen. Zie fig. 41. Vergr.: 1600 \times .

Met name BERNARD en GRANBOULAN (1960) menen op grond van electronmicroscopische waarnemingen, dat tussen lymphocyten en plasmacellen geen enkele verwantschap bestaat anders dan dat ze beide uit reticulumcellen zouden voortkomen. Door BRAAMS (1961) is er echter op gewezen, dat deze onderzoekers de jongste plasmacelvormen niet hebben herkend en ten onrechte hebben geplaatst in de lymphocyttaire ontwikkelingsreeks. LANGEVOORT (1961) heeft bovendien aangetoond dat tijdens de plasmacellulaire reactie in de milt wel degelijk celvormen worden aangetroffen, welke morphologisch intermediair zijn tussen lymphocyten en „transitional cells” van FAGRAEUS.

Ook in de lymphklieren van onze proeven blijken deze cellen te worden aangetroffen, voornamelijk op het moment dat plasmablasten tot ontwikkeling komen. In fig. 40 is bij sterkere vergroting een gebied afgebeeld uit fig. 33, afkomstig van een lymphklier 24 uur na een tweede PGG-injectie. In dit gebied, dat in een lymphocytenveld gelegen is aan

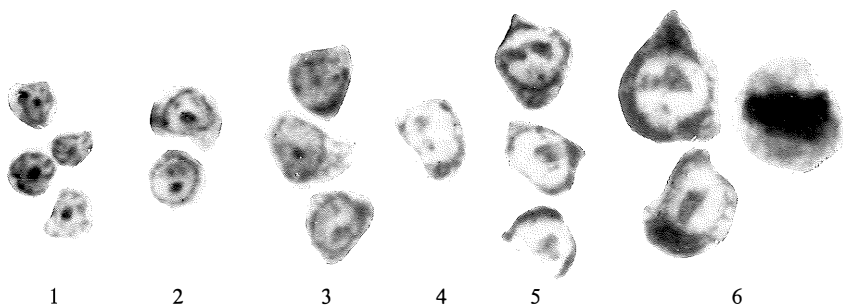


Fig. 41. Afzonderlijke cellen uit fig. 40. 1. lymphocyten; 2, 3 en 4. overgangscellen; 5. „transitional cells” (grote nucleoli); 6. plasmablasten, waarvan een in mitose.

de basis van een follikel, heeft op dit moment een stormachtige ontwikkeling van grote aantallen plasmablasten plaats. Behalve deze plasmablasten — waarvan een tweetal in mitose — zijn in fig. 40 ook een drietal „transitional cells” van FAGRAEUS te zien. Bovendien zijn in dit ene gezichtsveld naast de genoemde cellen tenminste een zestal cellen waarneembaar, welke morphologisch intermediair zijn tussen kleine lymphocyten en deze „transitional cells”. Fig. 41 toont deze cellen gerangschikt naar hun celgrootte en de pyroninophilie van hun cytoplasma. Het blijkt dat een nagenoeg continue reeks kan worden samengesteld van lymphocyt naar plasmablast, ondanks het grote verschil in cytologische kenmerken tussen deze twee cellen. De *plasmablast* is behalve door zijn celgrootte gekenmerkt door een intensieve basophilie van het cytoplasma, waarin de mitochondriën als uitsparing te zien zijn, en door de grootte en eveneens sterke pyroninophilie van de nucleolus. De „*transitional cells*” (FAGRAEUS) zijn wat kleiner, en de pyroninophilie van cytoplasma en nucleoli is minder sterk. De „*overgangsvormen*” tussen lymphocyten en deze „transitional cells” zijn gekenmerkt door een in deze reeks toenemende kerngrootte gepaard aan een lichter wordende chromatine-structuur, een geleidelijk toenemende hoeveelheid cytoplasma en sterker wordende pyroninophilie daarvan. In de laatste drie cellen van deze reeks waren kleine pyroninophiele nucleoli zichtbaar. Hoewel een reeks als de hier afgebeelde natuurlijk niet bewijzend is voor een transformatie van lymphocyt in plasmablast, is hiermee wel aangetoond dat het ontstaan van plasmablasten uit lymphocyten niet kan worden *verworpen* op grond van het *ontbreken* van overgangsvormen. Hier komt nog bij,

dat door ons nooit overgangsvormen zijn waargenomen tussen reticulumcellen en „transitional cells” van FAGRAEUS, respectievelijk „activated reticular cells” van MARSHALL en WHITE. De indruk bestaat, dat deze onderzoekers ook zelf dergelijke overgangscellen niet hebben gezien; uit hun naamgeving blijkt, dat zij de waarneming van respectievelijk „transitional cell” en „activated reticular cell” op zichzelf voldoende reden vinden om een overgang van reticulumcel naar plasmablast aan te nemen. Daartegenover staat de waarneming van LANGEVOORT en ons, dat juist tussen deze zogenaamde „transitional cell” en de lymphocyt een reeks van overgangsvormen lijkt voor te komen, zodat er ons inziens meer reden is de lymphocyt als de waarschijnlijke stamcel voor de plasmacelvorming te beschouwen.

Deze overgangsvormen vertonen onmiskenbaar enige gelijkenis met „medium-sized” lymphocyten, zoals die in actieve follikelcentra en in de thymus worden gevonden. De mogelijkheid, dat het hier om lymphocytenvorming gaat, lijkt echter niet zeer waarschijnlijk. In de eerste plaats worden celdelingen van deze „overgangscellen” niet waargenomen, bij „medium-sized” lymphocyten komen ze regelmatig voor. In de tweede plaats vertonen deze cellen, zoals uit fig. 41 al blijkt, een hele reeks van onderlinge verschillen, „medium-sized” lymphocyten daarentegen hebben een zeer uniform celbeeld. Tenslotte worden deze „overgangscellen” vooral waargenomen gedurende de beginperiode van de plasmacellulaire reactie, wanneer plasmablasten in grote aantallen ontstaan.

Indien de lymphocyt inderdaad moet worden beschouwd als de stamcel van de plasmocytaire reeks, zoals op grond van de beschikbare gegevens het meest waarschijnlijk lijkt, en dus mogelijk als de „immunologically competent cell”, dan krijgt een aantal feiten welke in dit hoofdstuk zijn besproken meer perspectief. In de eerste plaats de waarneming, dat de plasmablasten tot ontwikkeling komen in de lymphocytenvelden, waar een voortdurende „doorstroming” met lymphocyten moet worden aangenomen; lymphocyten die afkomstig zullen zijn zowel van de thymus, mogelijk het belangrijkste centrale orgaan voor de lymphocytenvorming, als van follikels in de lymfoïde organen. De lymphocytenvelden zouden dan het trefpunt zijn van deze lymphocyten met via de lympe aangevoerde antigenen. In kleurstof-injectieproeven wordt de sterkste phagocytose van met de lympe aangevoerd materiaal gevonden

„voorbij” dit trefpunt, in de mergsinussen. De geringe phagocytose, die onder deze omstandigheden in de lymphocytenvelden wordt waargenomen, kan mogelijk nog van betekenis zijn voor de wijze waarop de lymphocyten kennis krijgen van het antigeen. Voorts rijst de vraag of niet de follikels, die in de betreffende lymphocytenvelden zijn gelegen, een bijzondere positie innemen als vormingsplaatsen van lymphocyten, welke direct in de plasmacellulaire reactie zullen worden betrokken. De waarneming, dat bij alle plasmacellulaire reacties op paratyphus vaccin en tijdens de „secondary response” op paarden gamma-globuline, de eerst ontstane plasmablasten juist tot ontwikkeling komen aan de basis van de follikels, zou hierop kunnen wijzen. Uit de proeven echter, waarin door middel van röntgenbestraling de follikels als mogelijke bron van lymphocyten voor de plasmacellulaire reactie werden uitgeschakeld, is gebleken, dat ook zonder deze eventuele bron van „bijzondere lymphocyten” de plasmacellulaire reactie en het gehele proces van de antilichaamvorming nagenoeg normaal verloopt. Wanneer men bedenkt, dat juist onder invloed van het antigeen de lymphocytopoiese in de follikels, in de vorm van een follikelcentrumreactie tot ontwikkeling komt en dat in het pasgeboren organisme de follikelcentra pas ontstaan na de eerste contacten met antigeen, dan ligt de veronderstelling voor de hand, dat deze lymphocytopoiese in het bijzonder van betekenis is voor een eventueel volgende „secondary response” en dat in het beschikbaar zijn van deze lymphocyten de verklaring ligt voor de snellere en sterkere reactie van de „secondary response”.

De plasmacellulaire reactie in de lymphklier lijkt zich dus af te spelen tegen de achtergrond van voortdurende wisselingen van de structuur en celpopulatie van dit orgaan, welke wisselingen zelf weer samenhangen met de circulatie en recirculatie van de lymphocyten door het hele organisme. In wezen is hierdoor het gehele lymphoïde weefsel betrokken in de processen, die zich in de lymphklier afspelen. Men kan zich niet onttrekken aan de indruk, dat de gehele dynamiek van het lymphoïde systeem zelfs in hoofdzaak gericht is op de immunologische functie van dit systeem. Hierbij mag worden aangenomen dat deze immunologische functie niet beperkt blijft tot de antilichaamvorming, maar ook andere vormen van immunologische reacties zal omvatten zoals „delayed-type”-overgevoeligheid en transplantatie-immuniteit.

SAMENVATTING

Van de drie functies, die over het algemeen aan de lymphklier worden toegeschreven, bestaat alleen van de „filtratiefunctie” een duidelijk morphologisch en in zekere zin ook functioneel beeld. Van de lymphocytopoiese echter en van de antilichaamvorming is nog steeds niet bekend, waar ze in de lymphklier gelocaliseerd zijn, noch wat hun plaats is in het geheel van de histofysiologie van de lymphklier.

Voor de bestudering van de antilichaamvorming als functie van het lymphoïde weefsel zijn twee punten van bijzonder belang. In de eerste plaats worden antilichamen gevormd door plasmacellen en wel met dien verstande, dat deze cellen steeds nieuw ontstaan in reactie op een antigeen (FAGRAEUS), zoals geformuleerd in het concept van de plasmacellulaire reactie. In de tweede plaats zijn antilichamen eiwitten (gamma-globulinen), hetgeen impliceert, dat deze antilichaamvormende plasmacellen het kenmerkende celbeeld hebben van eiwitsynthetiserende cellen; voor het histologische onderzoek van dergelijke cellen, en daardoor voor het onderzoek van de plasmacellulaire reactie, leent zich bij uitstek de methylgroen-pyronine kleuring (BRACHET).

Van de lymphklier is uit vele waarnemingen bekend, dat plasmacellen in het bijzonder gelocaliseerd zijn in de mergstrengen. Over het verloop van de plasmacellulaire reactie in de lymphklier ontbreekt echter vrijwel iedere informatie. Bij de meeste onderzoeken is onvoldoende rekening gehouden met het directe verband tussen antigeentoediening en ontstaan van plasmacellen. Zo werden lymphklieren onderzocht na langdurige immunisaties door meerdere intraveneuze (!) en subcutane (soms niet eens regionale!) antigeeninjecties. De enkele onderzoekers, die hiermee wel rekening hielden, hebben de jongste fasen van de plasmacellulaire reactie niet als zodanig herkend, maar aangezien voor lymphocytenvorming.

Door ons is bij konijnen een onderzoek gedaan betreffende de „primary response” en de „secondary response” van de *popliteale lymphklier* na regionale, subcutane toediening van paratyphus-B(H) vaccin, zowel als na de toediening van paarden gamma-globuline. De „primary response” op paratyphus vaccinis bovendien onderzocht bij sublethaal bestraalde dieren.

Van de „primary response” op paratyphus vaccin is het verloop van

de histologische veranderingen in de lymphklier onderzocht en vergeleken met het verloop van antilichaamproductie in weefselcultures van dit orgaan en met de antilichaamtiteren in het serum. Bij de overige proeven werden de histologische veranderingen alleen vergeleken met de antilichaamtiteren in het serum. Als histologische controles van de op antigeen reagerende lymphklieren dienden de contra-laterale popliteale lymphklieren, welke steeds vóór de antigeeninjectie werden weggenomen. Daarnaast werd een aantal normale mesenteriale lymphklieren onderzocht.

Reeds bij het onderzoek van de normale lymphklieren werd een aantal bijzonderheden waargenomen. In de normale *popliteale* lymphklieren bleken de follikels steeds z.g. indifferente follikelcentra te bezitten; indien follikelreacties de betekenis hebben van lymphocytenvorming, dan kan dus in deze centra slechts een minimale lymphocytopoietische activiteit aanwezig zijn. In de lymphocytenvelden van de schors ontbrak iedere mitotische activiteit en werden geen blast-type cellen of andere jeugdvormen van lymphoïde cellen waargenomen. Daarentegen werden in deze lymphocytenvelden steeds verschillende stadia gezien van een proces, dat door ons „openbreken” der lymphocytenvelden is genoemd (fig. 5); hierbij veranderen deze velden in merggebieden, bestaande uit mergstrengen en mergsinussen. Tegelijkertijd komen in de lymphocytenvelden gelegen cellen — lymphocyten en reticulomcellen — in de nieuwgevormde mergsinussen terecht en worden deze met de lymfe afgevoerd; resten van de lymphocytenvelden — voornamelijk rondom arteriolen en venulen — blijven als mergstrengen achter. In de bestaande mergstrengen van de normale popliteale lymphklier waren altijd enige rijpe plasmacellen aanwezig. Slechts een enkele maal werd een actieve plasmacellulaire reactie waargenomen, welke dan geheel overeen kwam met de in het verdere onderzoek beschreven experimentele plasmacellulaire reacties; het betreffende dier bleef bij de proeven verder buiten beschouwing.

In tegenstelling tot de normale popliteale lymphklieren werden in de normale *mesenteriale* lymphklieren steeds zeer sterke plasmacellulaire reacties gevonden. Aangezien door vele onderzoekers juist de mesenteriale lymphklier als „normale” lymphklier werd onderzocht en beschreven, is hierdoor een onjuiste voorstelling verkregen van de bouw

van de normale lymphklier en van de processen, welke zich daarin afspelen.

De „primary response” van de popliteale lymphklier op paratyphus vaccin verliep volgens een kenmerkend patroon, dat in grote lijnen ook bij de overige proeven werd gevonden. Aan de *plasmacellulaire reactie* waren twee fasen te onderscheiden, welke elkaar overigens enigszins overlappen. De *eerste phase* was reeds 24 uur na de antigeeninjectie waarneembaar in de vorm van het verschijnen van een aantal „transitionnal cells” (FAGRAEUS) en plasmablasten, die in de lymphocytenvelden waren gelegen en wel tegen de bases van de follikels (fig. 7 en 8). Gedurende de volgende drie dagen werden — nu verspreid door de gehele lymphocytenvelden — jonge plasmocytaire elementen in steeds grotere getale aangetroffen (fig. 9 en 10); niet alleen kwamen aanvankelijk nog nieuwe plasmablasten tot ontwikkeling, maar bij de differentiatie van deze cellen tot onrijpe plasmacellen had ook een sterke mitotische vermenigvuldiging plaats. De *tweede phase* van de plasmacellulaire reactie bleek geheel te worden beheerst door het „openbreken” van de lymphocytenvelden, dat ook in deze lymphklieren steeds werd gevonden. Door de aanwezigheid van toenemende aantallen plasmablasten en vooral onrijpe plasmacellen in deze lymphocytenvelden, had het „openbreken” hier nl. tot gevolg, dat vanaf de derde dag behalve lymphocyten en reticulumcellen ook grote aantallen onrijpe plasmacellen in de nieuw gevormde sinussen terecht kwamen (fig. 11 en 12). Op deze wijze werd het merendeel van de tot ontwikkeling gekomen jonge plasmocytaire elementen omstreeks de 4e dag met de lympe afgevoerd; slechts een gering aantal bleef achter in de nieuwontstane mergstrengen en ontwikkelde zich daar verder tot rijpe plasmacellen.

In de follikels werd steeds vanaf de derde dag een karakteristieke follikelcentrumreactie gevonden, waarbij eerst blast-type cellen (lymphoblasten?) (fig. 13) en vanaf de vijfde dag „medium-sized” lymphocyten — waarvan vele in mitose — en gefagocyteerde „tingibele Körper” (fig. 14) het beeld beheersten.

Blijkens de *weefselkweek-proeven* begon de antilichaamproductie op de derde dag; de maximale productie werd bereikt op ongeveer de zesde dag (fig. 16). Dit was in overeenstemming met het verloop van de antilichaamtiters in het serum (fig. 15). Het begin van de antilichaamvorming

bleek samen te vallen met het eerste verschijnen van onrijpe plasmacellen; de stijging van de antilichaamproductie op de derde en vierde dag ging parallel met de toename van het aantal jonge plasmocyttaire elementen. Aangezien echter de grootste antilichaamvorming in de lymphklier werd gevonden op de vijfde en zesde dag, wanneer het aantal onrijpe plasmacellen al weer sterk is afgenomen — door afvoer via de mergsinussen en verdere differentiatie van de achtergebleven cellen — moet worden aangenomen, dat ook de rijpe plasmacellen antilichamen secernereren.

De „primary response” op paarden gamma-globuline bleek, in vergelijking met „primary response” op paratyphus vaccin, in vrijwel alle opzichten een identiek verloop te hebben, zowel wat betreft de plasmacellulaire reactie als de follikelcentrumreactie. Slechts twee verschillpunten moeten worden genoemd: de gehele plasmacellulaire reactie was ongeveer 24 uur vertraagd en de eerste plasmablasten verschenen (48 uur na de antigeeninjectie) niet aan de bases van de follikels, maar in groepjes midden in de lymphocytenvelden (fig. 18 t.m. 23). Voor de mogelijke betekenis van deze verschillen zij verwezen naar de „secondary response”.

Een antilichaamtiter in het serum werd pas op de vijfde dag voor het eerst waargenomen (fig. 17); hierbij moet echter in het oog worden gehouden, dat het paarden gamma-globuline in de gebruikte dosering in staat is een vrij grote hoeveelheid antilichaam — en juist het eerst gevormde — te binden.

De „secondary response” op paratyphus vaccin en op paarden gamma-globuline vertoonden in de microscopische praeparaten (resp. fig. 26 t.m. 28 en fig. 30 t.m. 36) in wezen opnieuw hetzelfde beeld van de plasmacellulaire reactie. Opvallend was echter het snellere begin en, vooral bij paarden gamma-globuline, het massale karakter, waarbij in twee tot drie dagen enorme aantallen onrijpe plasmacellen tot ontwikkeling kwamen. Dit laatste had tot gevolg, dat ook het aantal plasmacellen, dat na het „openbreken” van de lymphocytenvelden in de daarbij ontstane mergstrengen achterbleef, aanzienlijk groter was dan na de eerste antigeentoediening.

Een mogelijk belangrijk detail is, dat bij de „secondary response” op paarden gamma-globuline de eerstverschijnende plasmablasten niet zoals

bij de „primary response” centraal in de lymphocytenvelden ontstonden, maar nu ook aan de bases van de follikels waren gelocaliseerd. Indien dit laatste kenmerkend zou zijn voor de „secondary response” — de waarnemingen bij het paratyphus vaccin behoeven daarmee niet in strijd te zijn — dan zou dit een aanwijzing kunnen zijn, dat de follikels juist na een tweede antigeentoediening een rol spelen bij de vorming van plasmablasten.

De follikelcentrumreacties waren aan het begin van de „secondary response”, d.w.z. 28 dagen na een eerste antigeentoediening, nog niet tot rust gekomen (fig. 24 en 25). Een stimulering van deze reacties leek wel plaats te vinden, maar was moeilijk met zekerheid vast te stellen.

De antilichaamtiter bleken na de tweede paarden gamma-globuline injectie al vanaf de tweede dag een zeer sterke stijging te vertonen (fig. 29); de tweede paratyphus vaccin injectie had nauwelijks een verdere titerstijging ten gevolge.

Een totale röntgenbestraling van de proefdieren met 400 r. bleek in alle lymphoïde organen en dus ook in de popliteale lymphklier binnen 12 uur een nagenoeg volledige destructie van de follikels te veroorzaken, terwijl de lymphocytenvelden daarentegen slechts geringe schade vertoonden (fig. 38). Bij die dieren, welke een injectie met paratyphus vaccin ontvingen, onmiddellijk gevolgd door bestraling, werd een praktisch normale antilichaamvorming gevonden (fig. 37). In de lymphklieren, welke bij deze dieren resp. na vier en vier en een halve dag werden weggenomen, vertoonden de lymphocytenvelden het beeld van een sterke plasmacellulaire reactie (fig. 39), terwijl de follikels bijna allen geheel gedegeneerd waren. Hieruit mag geconcludeerd worden, (1) dat het celmateriaal van de lymphocytenvelden zelf tot de vorming van antilichaamproducerende plasmacellen in staat is, en (2) dat de follikelcentrumreacties, zoals die in niet-bestraalde dieren na antigeentoediening tot ontwikkeling komen, in het gelijktijdig zich afspelende proces van de antilichaamvorming tijdens de „primary response” geen essentiële rol spelen.

Om de hier beschreven waarnemingen te kunnen inpassen in de histofysiologie van de lymphklier, bleek het noodzakelijk de gehele dynamiek van het lymphoïde systeem aan een nadere beschouwing te onder-

werpen, met name de problemen van de lymphocytenvorming en van de lymphocyten-recirculatie.

Vrijwel algemeen wordt aangenomen, dat in de normale lymphklier een belangrijke nieuwvorming van lymphocyten plaats heeft, zowel in de lymphocytenvelden als in de follikels. Bij ons onderzoek van de normale popliteale lymphklier echter werden in de lymphocytenvelden geen, en in de follikelcentra slechts minimale tekenen gevonden van een eventueel als lymphocytopoiese te duiden activiteit. De klassieke follikelcentrumreacties werden alleen in de op antigeen reagerende lymphklieren aangetroffen; het waren hier de enige processen die als lymphocytenvorming konden worden opgevat. Het blijkt dat men vrijwel zonder uitzondering de plasmacellulaire reacties niet als zodanig heeft herkend, en daardoor (1) de op antigeen reagerende lymphklieren, in het bijzonder de mesenteriale lymphklier(!), als „normaal” heeft beschouwd, en (2) mitosen van plasmablasten en onrijpe plasmacellen zonder meer als uitingen van lymphocytenvorming heeft gezien.

Door tellingen van mitosen, en bepalingen van de deoxyribose-nucleïnezuur turn-over, heeft men voorts getracht een meer quantitative indruk te krijgen van de lymphocytenproductie. Ook in deze gevallen is nieuwvorming van cellen steeds zonder meer als lymphocytenproductie geïnterpreteerd. In vrijwel alle lymphoïde organen werd een zeer hoge cellenproductie gevonden, de hoogste in de thymus en de mesenteriale lymphklier(!).

Deze hoge uitkomsten schenen aanvankelijk te worden bevestigd door de waarneming, dat enorme aantallen lymphocyten per dag de bloedbaan bereiken via de d.thoracicus — $2 \text{ à } 10 \times$ het aantal in het bloed aanwezige lymphocyten. Op grond van verdere experimenten echter concludeerde GOWANS, dat het grootste deel (90 %) van deze d.thoracicus lymphocyten geen nieuwontstane elementen maar recirculerende lymphocyten waren, die reeds eerder in de bloedbaan hadden gecirculeerd en deze nu via de lymphoïde organen en de d.thoracicus weer opnieuw bereikten. Met deze opvatting van GOWANS behoeft een grote cellenproductie in de lymphoïde organen natuurlijk niet in strijd te zijn; een slechts geringe *lymphocyten*-productie zou wel een argument zijn vóór die opvatting.

Op grond van onze waarnemingen nu is het duidelijk, dat de in het lymphoïde systeem gemeten cellenproductie behalve lymphocyten-

vorming ook de vorming van grote aantallen plasmacellen omvat. Alleen in de thymus, waar geen plasmacellulaire reacties voorkomen, is de gemeten celproductie een betrouwbare maat voor de lymphocytopoiese. De thans beschikbare gegevens maken het dus waarschijnlijk, (1) dat de werkelijke lymphocytenvorming een zeer beperkte omvang heeft, (2) dat deze lymphocytopoiese voornamelijk plaats heeft in de thymus en waarschijnlijk ook in de follikels van de op antigeen reagerende lymphklieren (follikelcentrumreacties), en (3) dat deze lymphocyten betrokken worden in een proces van recirculatie, waarbij ze vanuit het lymphoïde weefsel in de bloedbaan geraken, vanuit de bloedbaan weer terugkeren in het lymphoïde weefsel en van hieruit weer in de bloedbaan komen, etc.

Voor de lymphklier heeft dit alles tot consequentie, dat een groot aantal lymphocyten uit de bloedbaan moet worden aangevoerd als tegenhanger van het weer vrijkomen van lymphocyten voor recirculatie, o.a. bij het „openbreken” van de lymphocytenvelden. Voor deze aanvoer lijken twee wegen open te staan: de afferente lymphbanen en de „epitheloïde” venulen in de lymphocytenvelden (fig. 3 en 4). Er is reden om aan te nemen dat vooral deze laatste hierbij een belangrijke rol spelen. De lymphocytenvelden krijgen in dit beeld de betekenis van tijdelijke lymphocytendepots.

In de voorstelling, die we ons moeten maken van de normale histofysiologie van de lymphklier, valt dus de betekenis van de lymphocytenvorming als één van de hoofdfuncties van het orgaan grotendeels weg; hiervoor komt in de plaats de, met lymphocyten-recirculatie samenhangende, voortdurende wisseling van de celpopulatie in de lymphocytenvelden en de daarmee gepaard gaande structuurveranderingen van de lymphklier.

In de op antigeen reagerende lymphklier speelt zich juist in deze lymphocytenvelden de plasmacellulaire reactie af. Als stamcel voor de hierbij nieuw ontstaande plasmablasten komen in aanmerking: de reticulumcel en de lymphocyt. De waarneming van cellen die morphologisch tussenvormen zijn tussen lymphocyten enerzijds en „transitional cells” en plasmablasten anderzijds (fig. 40 en 41) en het ontbreken van tussenvormen tussen reticulumcellen en „transitional cells” maken het waarschijnlijk dat de kleine lymphocyt de „immunologically competent cell” is, waaruit na stimulering met antigeen de plasmablast ontstaat.

In deze hypothese krijgen de lymphocytenvelden, met hun steeds wisselende lymphocytenpopulatie, de betekenis van ontmoetingspunten van deze lymphocyten met antigenen, welke door de binnenkomende lympe worden aangevoerd.

De follikelcentrumreacties, welke als gevolg van de antigeenprikkel naast de plasmacellulaire reactie tot ontwikkeling komen, zouden in deze voorstelling als teken van lymphocytenvorming van bijzondere betekenis kunnen zijn voor een eventuele „secondary response”.

Het hier geschetste beeld van de histofysiologie van de lymphklier mag natuurlijk niet in alle details als bewezen worden beschouwd; het moet slechts gezien worden als een, op concrete gegevens gebaseerde, werkhypothese voor verder experimenteel onderzoek.

SUMMARY

Three main functions are generally attributed to the lymph node. *Filtration of lymph*, passing through the lymph node on its way back to the blood stream, clearly takes place by the phagocytic activity of reticular cells. *Lymphocytopoiesis* is supposedly one of the main activities of the lymph node; however, neither its exact measure, nor its functional relationships with other functions of lymphoid tissue, nor even its localization in the lymph node is properly known. *Antibody formation*, lastly, has been established beyond any doubt in the lymph node; the responsible cells — plasma cells — have been duly recognized; but the fundamental processes leading to the development of antibody-producing plasma cells are not understood.

The present investigation aimed at an analysis of the so-called plasmacellular reaction in the lymph node. FAGRAEUS in formulating the concept of the plasmacellular reaction has stressed the important point that plasma cells arise „de novo” upon antigenic stimulation of lymphoid tissue. The first precursor cells to appear after the administration of antigen have been named „transitional cells”; these develop into plasmablasts, which in turn give rise to immature, and these to mature plasma cells. The immature plasma cells have been claimed to be the most actively antibody-synthesizing cells. During the plasmacellular reaction an active multiplication of the immature cells of the plasmacyte series is observed.

In the lymph node mature plasma cells are known mainly to be localized in the medullary cords. Regarding the course and particularly the early phases of the plasmacellular reaction in the lymph node, however, information is almost completely lacking. Most investigators did not sufficiently take into account the direct relationship between the administration of antigen and the development of plasma cells. Consequently lymph nodes have been investigated after multiple intravenous (!) and subcutaneous (not even regional!) antigen injections. The few investigators who properly used a single regional, subcutaneous antigen injection, upon examination of the lymph node did not recognize the youngest phases of the plasmacellular reactions but considered them to be signs of lymphocytopoiesis.

In the present investigation the primary and secondary antibody

response of the rabbit popliteal lymph node was examined after regional, subcutaneous injection of either paratyphoid-B(H) vaccine or horse gamma globulin. The course of the plasmacellular reactions and associated histological changes were examined in methylgreen-pyronin stained sections and compared with the course of serum antibody titers. In addition primary response antibody production resulting from the administration of paratyphoid vaccine was estimated in tissue cultures of these lymph nodes. Lastly the lymph node antibody response to paratyphoid vaccine was examined in rabbits irradiated sublethally immediately following the antigen injection.

Contra-lateral popliteal lymph nodes, removed surgically before antigen administration, and a number of normal mesenteric lymph nodes, served as histological controls.

Normal control popliteal lymph nodes consistently showed a definitely inactive aspect of the follicular centres; active follicular centre reactions were not observed. If such reactions can be taken to signify lymphocytopoiesis a minimal lymphocytopoietic activity, if any, existed in these nodes. In addition the cortical lymphocytic fields (fig. 2, page 6 and fig. 3, page 8) were devoid of any mitotic activity at all and blast-type or other immature lymphoid cells were completely absent. On the other hand these cortical lymphocytic fields always exhibited various phases of a process which we have called „dissolution” of the lymphocytic fields (fig. 5, page 21; see also figs. 11, 12, 22, 23, 26, 27 and 28 in the experimental series). Lymphocytic fields, undergoing this process of dissolution, changed into medullary areas (consisting of medullary cords and sinuses), the cells originally constituting the field — lymphocytes and reticular cells — being released in newly formed sinuses, and the remnants of the field remaining as medullary cords chiefly along the blood vessels. In the already existing medullary cords varying but generally small numbers of mature plasma cells were present. Only occasionally was an active plasmacellular reaction observed, histologically corresponding to the experimental plasmacellular reactions to be described, in which case the animal concerned was not used for further experiment.

In definite contrast (to these normal popliteal lymph nodes) the normal *mesenteric* lymph nodes were consistently engaged in very active plasmacellular reactions, presumably resulting from a regular inflow of in-

testinal antigens. As mesenteric lymph nodes have been regularly taken to represent supposedly „normal” lymph nodes, apparently incorrect views have arisen concerning the structure of the normal lymph node and the processes taking place in it.

The primary antibody response of the popliteal lymph node to paratyphoid vaccine proceeded along general lines which were identical for all experiments. The *plasmacellular reactions* exhibited two distinct, though overlapping, phases. The first signs of phase one were already observed 24 hours after antigen administration: a number of „transitional cells” (FAGRAEUS) and what proved to be plasmablasts had arisen in the cortical lymphocytic fields at the bases of the follicles (fig. 7, page 25 and fig. 8, page 26). Increasing numbers of young plasmacytic elements appeared throughout the lymphocytic fields during the following two or three days (fig. 9, page 27 and fig. 10, page 28) partly through new plasmablasts making their appearance, but largely through active mitotic multiplication of these cells during their differentiation into immature plasma cells. Phase two was characterized by the process of „dissolution” to which these plasmacell-containing lymphocytic fields were subjected like the normal fields in the control nodes. The presence of increasing numbers of immature plasma cells in these lymphocytic fields resulted in the release of a large number of these cells together with lymphocytes and reticular cells in the newly formed sinuses (fig. 11, page 29 and fig. 12, page 30); in this way the majority of the immature plasma cells were drained away by the passing lymph. Only small numbers were found remaining in the concomitantly formed medullary cords, where they completed their differentiation into mature plasma cells.

In the lymph *follicles* of these nodes a characteristic follicular centre reaction („germinal centre” activity) started about 3 days after the administration of antigen. The first changes led to blast-type cells (lymphoblasts?) prevailing in these centres (fig. 13, page 31); by the 5th day medium-sized lymphocytes — many of which showed mitoses — predominated with phagocytic reticular cells or macrophages loaded with „tingibele Körper” interspersed between them (fig. 14, page 32).

In the *tissue culture* experiments, antibody production was first noted in lymph nodes explanted 3 days after antigen administration; maximal

production was found in nodes explanted on the 6th day (fig. 16, page 35). These data corresponded to the course of the serum antibody titer (fig. 15, page 34). The first demonstrable elaboration of antibody coincided with the appearance of immature-type plasma cells; the increase of antibody production paralleled the increase in number of immature plasma cells. The finding of maximal antibody production on the 6th day, when these immature plasma cells had already decreased in number by being drained away along the sinuses and by differentiation to mature types of the remaining ones, suggests that these mature plasma cells do secrete antibody as well.

The primary antibody response to horse gamma globulin showed an almost identical course of events, as far as plasmacellular reactions and follicular centre reactions are concerned. Only two differences should be mentioned: the plasmacellular reaction was retarded by some 24 hours and the first plasmacellular precursor cells made their appearance not at the bases of the follicles but in small groups throughout the lymphocytic fields (figs. 18 through 23, pages 40 through 45).

Circulating antibody was not detected before the 5th day (fig. 17, page 39). It should be noted, however, that the antigen dosage used was such that one can assume that significant amounts of antibody — and more particularly of the antibody first elaborated — were bound.

Secondary responses to paratyphoid vaccine and to horse gamma globulin — elicited 28 days after the first antigen administration — again showed the same overall picture of the plasmacellular reaction (figs. 26 through 28, figs. 30 through 36 respectively, pages 50 through 62). In both cases, however, the plasmacellular reactions started and proceeded at a much faster rate and the number of plasmacytic elements developing in the lymphocytic fields was much larger and after horse gamma globulin even enormous. Accordingly the number of mature plasma cells which after dissolution of the lymphocytic fields were found remaining in medullary cords was also considerable.

It may be significant that during secondary response to horse gamma globulin the first appearing plasmablasts did not develop throughout the lymphocytic fields as in the corresponding primary response, but were clearly localized at the bases of the follicles as in the responses to paratyphoid vaccine. If it should be that this difference is of an essential

kind — which the observations with paratyphoid vaccine do not necessarily disprove — it might point to a special role of the follicles in the generation process of plasmablasts upon repeated antigen administration.

Follicular reactions, resulting from the first antigen administration, had not yet subsided after 28 days (fig. 24, page 48 and fig. 25, page 49). As far as could be ascertained they seemed to be stimulated during secondary response.

Antibody titers rose considerably upon the second horse gamma globulin injection from the 2nd day onwards (fig. 29, page 55); the second injection of paratyphoid vaccine, however, did not result in a significant titer rise.

Total body röntgen-irradiation (450 r) almost completely destroyed the follicles throughout the lymphoid tissue within 12 hours. In the lymph nodes the lymphocytic fields exhibited only minor damage (fig. 38, page 67). In the rabbits irradiated immediately after having received paratyphoid vaccine, an almost normal production of antibodies was found (fig. 37, page 66; cf. LANGEVOORT et al. 1961). The popliteal lymph nodes of these animals, removed after 4 and 4½ days, uniformly presented very active plasmacellular reactions in the lymphocytic fields, which again had survived the irradiation (fig. 39, page 69). As nearly all of the follicles had completely degenerated it may be concluded (i) that the cells constituting these fields are fully competent to give rise to antibody producing plasma cells, and (ii) that the follicular centre reactions („germinal centres”) developing during the plasmacellular reaction in non-irradiated animals do not themselves contribute essentially to the antibody production observed.

In order to incorporate the observations described so far in a concept of the histophysiology of the lymph node, it appeared necessary to reconsider the dynamics of the lymphoid system as a whole, and particularly the problems of lymphocytopoiesis and of lymphocyte-recirculation.

It is quite generally held that a considerable production of lymphocytes takes place in the normal lymph node, both in the follicles and in the cortical lymphocytic fields. In the present investigation, however, it was shown that in the normal (control) popliteal lymph node only minimal lymphocytopoietic activity may be attributed to the follicles

and none to the lymphocytic fields. Typical follicular centre reaction („germinal centres”) that may possibly be interpreted as lymphocytopoiesis were only found after antigenic stimulation. This observation corresponds to that of LANGEVOORT et al. concerning the rabbit spleen. Almost without exception investigators have not recognized the early phases of plasmacellular reactions. Consequently (i) antigen stimulated lymph nodes — particularly mesenteric lymph nodes! — have incorrectly been taken to represent „normal” lymph nodes and (ii) mitoses of plasmablasts and of immature plasma cells have been mistaken for lymphocytic multiplication.

Mitotic counts and DNA-turnover rates have been used to estimate quantitatively lymphocyte production. Also in these cases new-production of cells was always interpreted as new-production of lymphocytes. By these experiments it has been deduced that high rates of „lymphocytopoiesis” exist in nearly all lymphoid organs (see YOFFEY), the highest in the thymus and in mesenteric lymph nodes(!).

At first these conclusions appeared to be confirmed by the observation of enormous numbers of lymphocytes entering the blood stream by way of the thoracic duct — 2 to 10 times the total blood lymphocyte number. Experiments of GOWANS, however, seem to demonstrate that the majority (90 %) of thoracic duct lymphocytes are not newly produced cells but recirculating lymphocytes which, having been discharged in the blood stream, return to lymphoid tissue and subsequently reenter the circulation by way of the thoracic duct. It will be clear that a large scale new-production of lymphoid cells does not necessarily disprove the recirculation concept of GOWANS; on the other hand the demonstration of an only limited rate of lymphocyte production would clearly support that concept.

From the observations reported here it may be concluded that the new-production of cells in the lymphoid system as estimated by mitotic counts or DNA-turnover rates not only comprised lymphocytopoiesis but in addition the production of large numbers of plasmacytic elements. Only in the thymus can mitotic counts etc. be taken truly to represent lymphocyte formation, as plasmacellular reactions do not occur in thymus parenchyma. The available data so far seem to justify the conclusion (i) that lymphocytes are being produced at a very moderate rate, (ii) that lymphocyte production is mainly localized in the thymus and

possibly in the follicles of antigenically stimulated lymphoid organs, and (iii) that lymphocytes do re-circulate to a large measure i.e. enter the blood stream after having been formed, return to lymphoid tissue by migration from the blood, to be discharged again in the blood circulation etc.

Accordingly the normal lymph node is presumably continuously supplied with large numbers of blood lymphocytes to compensate for lymphocyte release by dissolution of lymphocytic fields and possibly by other ways. Two supply routes may be envisaged: the afferent lymph vessels and the epitheloid venules of the cortical fields themselves (fig. 3, page 8 and fig. 4, page 9), which seem to represent places of lymphocyte exchange. The lymphocytic fields, in this concept, should be considered temporary lymphocyte depots.

Upon reconsideration of lymph node histophysiology it would seem that lymphocytopoiesis cannot be taken to represent one of its main functions anymore; the continuous or intermittent change of the lymphocyte population in the cortical lymphocytic fields, related to lymphocyte re-circulation, would appear to be the main feature as far as the lymphocytes themselves are concerned. The concomitant changes of the overall structure of the lymph node are the direct morphological signs of this lymphocyte change.

Upon antigenic stimulation a plasmacellular reaction is induced in these lymphocytic fields. Two cell types might be considered as the stem-cell of the developing of plasmacytic elements: the reticular cell and the small lymphocyte. The observation of morphologically intermediate cell-types between small lymphocytes on the one hand and „transitional cells” and plasmablasts on the other (fig. 40, page 82 and fig. 41, page 83), and the lack of such intermediates between reticular cells and „transitional cells”, strongly suggest that the small lymphocyte itself is the immunologically competent cell from which the plasmablast arises after antigenic stimulation.

By this hypothesis, the cortical lymphocytic fields, with their continuously changing lymphocyte population, would seem to represent the meeting point of lymphocytes and the antigens carried along with affluent lymph. Presumably other immunological functions of lymphoid tissue may fit in with this picture.

The follicular centre reactions might conceivably represent active

lymphocytopoiesis, but if so then only in response to antigen stimulation. The lymphocytes possibly arising here might play some special role in the secondary antibody response.

The concept of lymph node histophysiology as presented here certainly cannot be considered proven in all its details; it should be seen as a working hypothesis, based on the available data, enabling further experimental investigation of the existing problems to be carried out.

TABEL.

Antilichaamproductie in weefselculturen van lymphklier, milt en beenmerg, ge-explanteerd 1, 2, 3, 4, 5, 6 en 9 × 24 uur na de antigeentoeediening. (Zie hoofdstuk 2, pag. 35.)

Konijn nr.:	lymphklier				milt				beenmerg			
	gewicht in mg.	extr tit.	cult tit.	prod. getal	gewicht in mg.	extr tit.	cult tit.	prod. getal	gewicht in mg.	extr tit.	cult tit.	prod. getal
1e dag												
1	59	0	0		82	0	0		49	0	0	
2	31	0	0		32	0	0		60	0	0	
2e dag												
3	60	0	0		89	0	0		41	0	0	
4	81	0	0		92	0	0		28	0	0	
3e dag												
5	36	0	2	5,5	82	0	0		47	0	0	
6	49	0	4	8,2	61	0	0		25	0	0	
7	42	0	0		86	0	0		29	0	0	
4e dag												
8	—	—	—		95	0	64	67	65	0	8	12
9	53	0	32	60,5	87	0	64	83	54	0	3	6
10	32	0	4	12,5	78	0	0		57	0	0	
11	80	0	8	10	78	0	0		25	0	0	
5e dag												
12	19	0	8	42	94	0	2	2,1	47	0	0	
13	34	2	16	41	93	0	8	8,5	50	0	0	
14	41	4	16	29	70	0	8	11,5	20	0	0	
6e dag												
15	32	8	32	75	75	0	2	2,8	24	0	0	
16	25	0	0		98	0	8	8	26	0	0	
17	12	2	8	50	80	0	2	2,5	26	0	0	
18	25	2	16	56	96	0	16	16,5	24	0	0	
9e dag												
19	34	0	4	11	85	0	0		21	0	0	
20	30	0	8	28	62	0	4	7	43	0	0	

LITERATUUR

- ANDREASEN, E. Observations on proliferation and death of lymphocytes.
1959. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 19.
Ed: F. Stohman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- ANDREASEN, E. and CHRISTENSEN, S. The rate of mitotic activity in the lymphoid organs of the rat.
1949. *Anat. Rec.* **103**: 401.
- ANDREASEN, E. and OTTESEN, J. Significance of the various lymphoid organs to the lymphocyte production in the albino rat.
1944. *Acta path. et microbiol. Scandinav. Supplement* **54**: 25.
- ANDREW, W. and ANDREW, N. V. Age changes in the deep cervical lymph nodes of 100 Wistar institute rats.
1948. *Am. J. Anat.* **82**: 105.
- ASCHOFF L. Ueber die lymphatischen Organe.
1938/39. *Anat. Anz. Ergänzungsheft* **87**: 152.
- BEGEMANN, H. Lymphatisches System und Antikörperbildung.
1952. *Deutsche med. Wchnschr.* **77**: 436.
- BERNHARD, W. and GRANBOULAN, N. Ultrastructure of immunologically competent cells.
1960. In: Ciba symposium on cellular aspects of immunity. bl. 92.
Ed: G. E. W. Wolstenholme en M. O'Connor; J. & A. Churchill Ltd., London.
- BING, J. and PLUM, P. Serum proteins in leucopenia.
1937. *Acta med. Scandinav.* **92**: 415.
- BJØRNEBOE, M. and GORMSEN, H. Experimental studies in the role of plasma cells as antibody producers.
1943. *Acta path. et microbiol. Scandinav.* **20**: 649.
- BLOOM, W. Histopathology of irradiation from external and internal sources.
1948. McGraw-Hill Book Company, Inc.
- BRAAMS, W. Electron microscopy of plasma cell development.
1961. *Acta morph. Neerl. Scandinav.* **4**: 289 (abstract).
- BRACHET, J. La détection des acides pentose nucléiques.
1940. *Compt. rend. Soc. de biol.* **133**: 88
- BRACHET, J. The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid.
1953. *Quart. J. Micr. Sc.* **94**: 1.
- BRAUNSTEINER, H. Physiologie und Physiopathologie der weissen Blutzellen.
1959. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- BRUYN, P. P. H. DE; The effect of X rays on the lymphatic nodule with reference to the dose and relative sensitivities of different species.
1948. *Anat. Rec.* **101**: 373.
- CASPERSSON, T. The relation between nucleic acid and protein synthesis.
1947. In Symposium on nucleic acid. University Press, London.
- CONWAY, E. A. Cyclic changes in lymphatic nodules.
1937. *Anat. Rec.* **69**: 487.
- CONWAY, E. A. Reaction of lymphatic tissue in early stages of Bacterium monocytogenes infection.
1938. *Arch. Path.* **25**: 200.

- CRADDOCK, G., PERRY, S. and LAWRENCE, J. S. Control of the steady state proliferation of leucocytes.
1959. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 255.
Ed: F. Stohman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- CRONKITE, E. P., FLIEDNER, T. M., BOND, V. P. and ROBERTSON, J. S. Anatomic and physiologic facts and hypotheses about hemopoietic proliferating systems.
1959. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 1.
Ed: F. Stohman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- CUSHING, J. E. and CAMPBELL, D. H. Principles of immunology.
1957. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
- DABELOW, A. Die Blutgefäßversorgung der lymphatischen Organe.
1938/39. Anat. Anz. Ergänzungsheft **87**: 179.
- DAWSON, A. B. Modified lymph nodes from dogs with a known history of irradiation including a note on globule leucocyte formation.
1927. Anat. Rec. **36**: 1.
- DEGARA, P. F. and ANGEVINE, D. M. Studies on the site of antibody formation in rabbits following intracutaneous injections of pneumococcus or of streptococcus vaccine.
1943. J. Exper. Med. **78**: 27.
- DIXON, I. J., ROBERTS, J. C., and WEIGLE, W. O. Quantitative aspects of antibody responses of transferred lymph node and peritoneal exudate cells.
1957. Federation Proc. **16**: 649.
- DIXON, F. J., TALMAGE, D. W., MAURER, P. H. and DEICHMILLER, M. The half-life of homologous gamma globulin (antibody) in several species.
1952. J. Exper. Med. **96**: 313.
- DOUGHERTY, T. F. Adrenal cortical control of lymphatic tissue mass.
1959. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 264.
Ed: F. Stohman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- DRAPER, L. R. and SÜSSDORF, D. H. The serum hemolysin response in intact and splenectomized rabbits following immunization by various routes.
1957. J. Infect. Dis. **100**: 147.
- DRINKER, C. K., WISLOCKI, G. B. and FIELD, M. E. The structure of the sinuses in the lymph nodes.
1933. Anat. Rec. **56**: 261.
- EHRICH, W. The anatomy of the secondary nodules and some remarks on the lymphatic and lymphoid tissue.
1929a. Am. J. Anat. **43**: 347.
- EHRICH, W. The first appearance of the secondary nodules in the embryology of the lymphatic tissue.
1929b. Am. J. Anat. **43**: 385.
- EHRICH, W. The role of the lymphocyte in the circulation of the lymph.
1946. Ann. New York Acad. Sc. **46**: 823.
- EHRICH, W. Die zellulären Bildungsstätten der Antikörper.
1955. Klin. Wchnschr. **33**: 315.
- EHRICH, W., DRABKIN, D. L. and FORMAN, C. Nucleic acids and the production of antibody by plasma cells.
1949. J. Exper. Med. **90**: 157.
- EHRICH, W. and HARRIS, T. N. The formation of antibodies in the popliteal lymph node in rabbits.
1942. J. Exper. Med. **76**: 335.

- EVERETT, N. B., REINHARDT, W. O., and YOFFEY, J. M. The appearance of labeled cells in the thoracic duct lymph of the guinea pig after the administration of tritiated thymidine.
1960. *Blood* **15**: 82.
- EVERETT, N. B., RIEKE, W. O., REINHARDT, W. O. and YOFFEY, J. M. Radioisotopes in the study of blood cell formation with special reference to lymphocytopoiesis.
1960. In: Ciba symposium on haemopoiesis. bl. 43.
Ed: G. E. W. Wolstenholme en M. O'Connor; J. & A. Churchill Ltd., London.
- FAGRAEUS, A. Antibody production in relation to the development of plasma cells.
1948. *Acta med. Scandinav. Supplement* **204**.
- FICHTELIUS, K. E. On the fate of the lymphocyte.
1953. *Acta anat. Supplement* **19**.
- FICHTELIUS, K. E. Further experiments on the biphasic appearance in the blood of lymphocytes labeled with radioactive phosphorus.
1957. *Acta anat.* **31**: 150.
- FICHTELIUS, K. E. The influence of immunization on lymphocytes shown by transfusion of labeled lymphocytes.
1959a. *Acta path. et microbiol. Scandinav.* **46**: 142.
- FICHTELIUS, K. E. Homologous and heterologous transplantation of radioactively labeled lymphocytes as a method of studying their function.
1959b. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 166.
Ed. F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- FICHTELIUS, K. E. On the destination of thymus lymphocytes.
1960. In: Ciba symposium on haemopoiesis. bl. 204.
Ed: G. E. W. Wolstenholme en M. O'Connor; J. & A. Churchill Ltd., London.
- FICHTELIUS, K. E. and DIDERHOLM, H. On the recirculation of lymphocytes from the lymph to the blood.
1959. *Acta haematol.* **22**: 322.
- FLEMMING, W. Studien über Regeneration der Gewebe.
1885a. *Arch. f. mikr. Anat.* **24**: 50.
- FLEMMING, W. Schlussbemerkungen über die Zellvermehrung in den lymphoiden Drüsen.
1885b. *Arch. f. mikr. Anat.* **24**: 355.
- FURUTA, W. J. An experimental study of lymph node regeneration in rabbits.
1947. *Am. J. Anat.* **80**: 437.
- GENGOZIAN, N. and MAKINODAN, T. Relation of primary antigen injection to time of irradiation on antibody production in mice.
1958. *J. Immunol.* **80**: 189.
- GILLMAN, J. and GILLMAN, Th. The pathogenesis of experimentally produced lymphomata in rats.
1952. *Cancer* **5**: 792.
- GLIMSTEDT, G. Bacterienfreie Meerschweinchen.
1936. *Acta path. et microbiol. Scandinav. Supplement* **30**.
- GOWANS, J. L. The effect of the continuous re-infusion of lymph and lymphocytes on the output of lymphocytes from the thoracic duct of unanaesthetized rats.
1957. *Brit. J. Exper. Path.* **38**: 67.
- GOWANS, J. L. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat.
1959a. *J. Physiol.* **146**: 54.
- GOWANS, J. L. The transfusion of lymphocytes in experimental animals.

- 1959b. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 64.
Ed: F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- GRUNDMANN, E. Die Bildung der Lymphocyten und Plasmazellen im lymphatischen Gewebe der Ratte.
1958a. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. **119**: 217.
- GRUNDMANN, E. Experimentelle Untersuchungen über die funktionelle Cytomorphologie der lymphatischen Strukturen bei Entzündung sowie unter Cortison und DOCA.
1958b. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. **119**: 377.
- GYLLENSTEN, L. Reaktioner från lymfnodi efter bakteriell inokulation hos nyfödda marsvin.
1946. Nord. med. **32**: 2304.
- HAGEN, Ch. H. and ZIRKLE, R. E. Methods of exposure of animals to X rays.
1954. Nat. nucl. energ. series **22B**: 517.
- HAMILTON, L. D. Nucleic acid turnover studies in human leukemic cells and the function of lymphocytes.
1956. Nature **178**: 597.
- HAMILTON, L. D. Control of lymphocyte production.
1957. In: Brookhaven symposia in biology No. 10: Homeostatic mechanisms. bl. 52. Brookhaven national laboratory, Upton, New York.
- HAMILTON, L. D. Control and function of the lymphocyte.
1958. Ann. New York Acad. Sc. **73**: 39.
- HAMILTON, L. D. Carbon ¹⁴-labeling of DNA in studying hematopoietic cells.
1959. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 151.
Ed: F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- HANSEN, H. G. Die Physiologie des Lymphocytenwechsels und seine Beeinflussbarkeit durch Hormone des Hypophysen-Adrenalsystems.
1958. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HARRIS, T. N. and HARRIS, S. Histochemical changes in lymphocytes during the production of antibodies in lymph nodes of rabbits.
1949. J. Exper. Med. **90**: 169.
- HARRIS, T. N. and HARRIS, S. Formation of agglutinins to Shigella Paradyse enteriae by transfer of lymph node cells.
1957. Federation Proc. **16**: 643.
- HEIBERG, K. A. Das Aussehen und die Funktion der Keimzentren des adenoiden Gewebes.
1922/23. Arch. Path. Anat. **240**: 301.
- HELLMAN, T. Studien über das lymphoide Gewebe. Die Bedeutung der Sekundärfollikel.
1921. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. **68**: 333.
- HELLMAN, T. Lymphgefäße, Lymphknötchen und Lymphknoten.
1930. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. **VI/1**: 233.
Ed: W. von Möllendorff; Julius Springer, Berlin.
- HELLMAN, T. Lymphgefäße, Lymphknötchen und Lymphknoten.
1943. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. **VI/4**: 200.
Ed: W. von Möllendorff; Julius Springer, Berlin.
- HELLMAN, T. und WHITE, G. Das Verhalten des lymphatischen Gewebes während eines Immunisierungsprozesses.
1930. Virchows Arch. f. path. Anat. **278**: 221.
- HILL, M. DNA labeling in bone marrow cells of X irradiated mice receiving homologous ³²P-lymphocytes.

1961. *Exper. cell research.* **24**: 405.
- HOEPKE, H. Keimzentren oder Reaktionszentren?
1955. *Ztschr. f. d. ges. inn. Med. u. i. Grenzgeb.* **10**: 201.
- HOLMAN, R. L. The structure and function of lymph nodes.
1955. *South. M. J.* **48**: 1311.
- HOLUB, M. Morphological changes in lymphocytes cultivated in diffusion chambers during the primary antibody response to a protein antigen.
1960. In: *Mechanisms of antibody formation; Proceedings of a symposium held in Prague. Publishing house of the Czechoslovak academy of sciences.*
- HUGHES, R., MAY, A. J. and WIDDICOMBE, J. G. The output of lymphocytes from the lymphatic system of the rabbit.
1956. *J. Physiol.* **132**: 384.
- JOB, T. T. Lymphatico-venous communications in the common rat and their significance.
1918. *Am. J. Anat.* **24**: 467.
- KELLER, L. Der Bau des Lymphknotens.
1951. *Anat. Anz. Supplement* **97**: 92.
- KEUNING, F. J. and SLIKKE, L. B. VAN DER; The role of immature plasma cells, lymphoblasts, and lymphocytes in the formation of antibodies, as established in tissue culture experiments.
1950. *J. Lab. & Clin. Med.* **36**: 167.
- KIHARA, T., TSUJI, I. und SHIMIZU, T. Experimentelle Untersuchung über die Wiederherstellung des Lymphknotens unter Berücksichtigung von Sekundärknötchen und Lymphoblasten.
1959. *Acta Scol. Med. Univ. in Kioto* **36**: 41.
- KINDRED, J. E. A quantitative study of the hemopoietic organs of young adult albino rats.
1942a. *Am. J. Anat.* **71**: 207.
- KINDRED, J. E. A quantitative study of the production of lymphocytes by the lymph nodes of the adult albino rat.
1942b. *Anat. Rec.* **82**: 471.
- KINDRED, J. E. Quantitative studies on lymphoid tissues.
1955. *Ann. New York Acad. Sc.* **59**: 746.
- KLINE, D. L. DNA-P³² studies of white blood cell formation, distribution and life span.
1959. In: *The kinetics of cellular proliferation.* bl. 142.
Ed: F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- KÖLLIKER, A. Handbuch der Gewebelehre des Menschen.
1852. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- LAJTHA, L. G., OLIVER, R., KUMATORI, T. and ELLIS, F. On the mechanism of radiation effect on DNA synthesis.
1958. *Rad. Research* **8**: 1.
- LANGEVOORT, H. L. The role of lymphocytes in the development of plasma cells.
1961. *Acta morph. Neerl. Scandinav.* **4**: 288 (abstract).
- LANGEVOORT, H. L., KEUNING, F. J., MEER, J. v. D., NIEUWENHUIS, P. and OUDENDIJK, P. Histogenesis of the plasmacellular reaction in the spleen during primary antibody response in normal and sublethally X-irradiated rabbits.
1961. *Proc. Kon. Ned. Acad. v. Wetensch.* **64**: 397.
- LEBLOND, C. P. Classical technics for the study of the kinetics of cellular proliferation.
1959. In: *The kinetics of cellular proliferation.* bl. 31.
Ed: F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.

- LEBLOND, C. P. and SAINTE-MARIE, G. Models for lymphocyte and plasmocyte formation.
1960. In: Ciba symposium on haemopoiesis. bl. 152.
Ed: G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor; J. & A. Churchill Ltd., London.
- LEDUC, E. H., COONS, A. H. and CONNOLLY, J. M. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit.
1955. *J. Exper. Med.* **102**: 61.
- LEIBER, B. und RIND, H. J. Der menschliche Lymphknoten.
1961. Urban & Schwarzenberg, München und Berlin.
- LOUTIT, J. F. Cell transfusion and its significance in relation to blood cell formation.
1960. In: Ciba symposium on haemopoiesis. bl. 132.
Ed: G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor; J. & A. Churchill Ltd., London.
- MC MASTER, P. D. and HUDACK, S. S. The formation of agglutinins within lymph nodes.
1935. *J. Exper. Med.* **61**: 783.
- MAJOOR, C. L. H. The possibility of detecting individual proteins in blood serum by differentiation of solubility curves in concentrated sodium sulfate solutions.
1947. *J. Biol. Chem.* **169**: 583.
- MARSHALL, A. H. E. and WHITE, R. G. Reactions of the reticular tissues to antigens.
1950. *Brit. J. Exper. Path.* **31**: 157.
- MAXIMOW, A. Bindegewebe und blutbildende Gewebe.
1927. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. II/1: 232.
Ed: W. von Möllendorff; Julius Springer, Berlin.
- MAXIMOW, A. and BLOOM, W. A textbook of histology.
1957. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- OSGOOD, E. E., TIVEY, H., DAVISON, K. B., SEAMAN, A. J. and LI, J. G. The relative rates of formation of new leukocytes in patients with acute and chronic leukemias.
1952. *Cancer* **5**: 331.
- OTTESEN, J. On the age of human white cells in peripheral blood.
1954. *Acta physiol. Scandinav.* **32**: 75.
- RINGERTZ, N. and ADAMSON, C. A. The lymph node response to various antigens.
1950. *Acta path. et microbiol. Scandinav.* Supplement **86**.
- ROBERTS, J. C. Role of lymphocyte in antibody formation.
1960. In: *The lymphocyte and lymphocytic tissue*. bl. 82.
Ed: J. W. Rebuck; P. B. Hoeber, Inc., New York.
- SANDERS, A. G., FLOREY, H. W. and BARNES, I. M. The output of lymphocytes from the thoracic duct in cats and rabbits.
1940. *Brit. J. Exper. Path.* **21**: 254.
- SCHOOLEY, J. C., BRYANT, B. J. and KELLY, L. S. Preliminary autoradiographic observations of cellular proliferation in lymphoid tissues, using tritiated thymidine.
1959. In: *The kinetics of cellular proliferation*. bl. 208.
Ed: F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- SCHRECK, R. Radiation effects on lymphocytes.
1960. In: *The lymphocyte and lymphocytic tissue*. bl. 125.
Ed: J. W. Rebuck; P. B. Hoeber, Inc., New York.
- SCHUMACHER, S. VON; Ueber Phagocytose und die Abfuhrwege der Leucocyten in den Lymphdrüsen.
1899. *Arch. f. mikr. Anat.* **54**: 311.
- SJÖVALL, A. und SJÖVALL, H. Experimentelle Studien über die Sekundärknötchen in

- den Kniekehlenlymphknoten des Kaninchens bei *Bacillus pyocyaneus* Infektion.
1930. *Virchows Arch. f. path. Anat.* **278**: 258.
- SJÖVALL, H. Experimentelle Untersuchungen über das Blut und die blutbildende Organe — besonders das lymphatische Gewebe — des Kaninchens bei wiederholten Aderlässen.
1936. *Acta path. et microbiol. Scandinav. Supplement* **27**.
- STAVITSKY, A. B. Micromethods for the study of proteins and antibodies.
I. Procedure and General applications.
1954. *J. Immunol.* **72**: 360.
- STERZL, J. Maintenance of the ability of cells cultivated in vitro to commence formation of antibodies.
1959. *Experientia* **15**: 62.
- SÜSSDORF, D. H. and DRAPER, L. R. The primary hemolysin response in rabbits following shielding from X rays or X irradiation of the spleen, appendix, liver or hind legs.
1956. *J. Infect. Dis.* **99**: 129.
- TALIAFERRO, J. H. and TALIAFERRO, L. G. X-ray effects on hemolysin formation in rabbits with the spleen shielded or irradiated.
1956. *J. Infect. Dis.* **99**: 109.
- THORBECKE, G. J. Over de vorming van antilichamen en gamma-globuline „in vitro“ in bloedvormende organen.
1954. Dissertatie, Groningen.
- TISCHENDORF, F. Autoradiographische Untersuchungen zur Frage des Eiweiszstoffwechsels in den lymphoretikulären Organen.
1958. *Experientia* **14**: 379.
- TISCHENDORF, F. und LINNARTZ-NIKLAS, A. Autoradiographische Untersuchungen an Milz und Lymphknoten verschiedener Säugetiere.
1958. *Anat. Anz.* **105**: 400.
- TISELIUS, A. and KABAT, E. A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations.
1939. *J. Exper. Med.* **69**: 119.
- TRAUTMANN, FR. und LIPPMANN, H. Zum feingeweblichen Strukturbild des Rattenlymphknotens.
1958. *Ärztliche Forschung* **12**: 152.
- TROWELL, O. A. The sensitivity of lymphocytes to ionising radiation.
1952. *J. Path. & Bact.* **64**: 687.
- TROWELL, O. A. Re-utilization of lymphocytes in lymphopoiesis.
1957. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**: 317.
- TROWELL, O. A. The lymphocyte.
1958. In: *International review of cytology.* **VII**: 235.
Ed: Bourne, G. H. en Danielli, J. F.; Academic Press Inc., New York.
- WARD, P. A. and JOHNSON, A. G. Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation.
1959. *J. Exper. Med.* **109**: 463.
- YOFFEY, J. M. Cellular equilibria in blood and blood-forming tissues.
1957. In: *Brookhaven symposia in biology* No. 10: Homeostatic mechanisms. bl. 1.
Brookhaven national laboratory, Upton, New York.
- YOFFEY, J. M. The lymphomyeloid complex.
1960. In: *Ciba symposium on haemopoiesis.* bl. 1.
Ed: G. E. W. Wolstenholme en M. O'Connor; J. & A. Churchill Ltd., London.

- YOFFEY, J. M. and COURTICE, F. C. Lymphatics, lymph and lymphoid tissue.
1956. Edward Arnold Ltd., London.
- YOFFEY, J. M., EVERETT, N. B. and REINHARDT, W. O. Labeling of cells in thoracic duct lymph of the guinea pig after tritiated thymidine.
1958. *Nature* **182**: 1608.
- YOFFEY, J. M., EVERETT, N. B. and REINHARDT, W. O. Cellular migration streams in the hemopoietic system.
1959. In: The kinetics of cellular proliferation. bl. 69.
Ed: F. Stohlman Jr.; Grune & Stratton, New York.
- YOFFEY, J. M., HANKS, G. A. and KELLY, L. S. Some problems of lymphocyte production.
1958. *Ann. New York Acad. Sc.* **73**: 47.

